

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 177**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2005 E 10158238 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 2214018**

54 Título: **Métodos, agentes y ensayos de detección de compuestos para inducir diferenciación de células de mamífero no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos**

30 Prioridad:

27.04.2004 WO PCT/EP2004/004522

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.10.2013

73 Titular/es:

**GALAPAGOS N.V. (100.0%)
GENERAAL DE WITTELAAN 11 A3
2800 MECHELEN, BE**

72 Inventor/es:

**VAN ROMPAEY, LUC JULIAAN CORINA;
TOMME, PETER HERWIG MARIA y
BROWN, ROBIN JOHN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 427 177 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos, agentes y ensayos de detección de compuestos para inducir diferenciación de células de mamífero no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de las enfermedades de mamíferos que implican una disminución sistémica o local de la densidad ósea media.

10

Antecedentes de la invención

El hueso contiene dos estructuras celulares distintas, es decir, células de formación ósea (por ejemplo, osteoblastos) y células de resorción ósea (por ejemplo, osteoclastos). El hueso es un tejido dinámico que se destruye continuamente (está sometido a resorción) y se reconstruye, por medio de una combinación complicada entre estos osteoblastos y osteoclastos. Para los osteoclastos, se ha establecido bien una cascada de factores de transcripción y factores de desarrollo implicados en la evolución desde la células progenitoras hasta el osteoclasto funcional. Por el contrario, se sabe poco sobre la estructura de los osteoblastos.

15

20

Los osteoblastos proceden de células progenitoras mesenquimales diferenciadas (MPCs). Durante la diferenciación para dar lugar a osteoblastos se sobre-regula la actividad de la fosfatasa alcalina ósea (BAP). La formación ósea in vivo tiene lugar a través de dos mecanismos distintos durante el desarrollo embrionario: osificación endocondrial e intra-membranosa (figura 1). Como se muestra en esta figura, el progenitor mesenquimal o los hemocitoblastos representan los puntos de partida para ambas formas de la formación ósea. Durante la osificación intra-membranosa, los huesos lisos tales como los del cráneo o clavícula, se forman directamente a partir de condensaciones de células mesenquimales. Durante la formación de los huesos largos, tales como los huesos de las extremidades, las condensaciones mesenquimales conducen primero a un intermedio cartilaginoso que es invadido durante el desarrollo adicional por parte de las células endoteliales, osteoclastos y células mesenquimales que se diferenciarán para dar lugar a osteoblastos y osteocitos (Nakashima and De Crombrughe, 2003).

25

30

Se conoce un número de enfermedades que están provocadas por una alteración del equilibrio de ajuste fino entre la resorción ósea y la formación ósea, en el que las enfermedades esqueléticas representan un número grande de pacientes: hipercalcemia de tumor maligno, enfermedad de Paget, enfermedades óseas inflamatorias tales como artritis reumática y enfermedad periodontal, osteogénesis localizada que tiene lugar durante las metástasis esqueléticas, síndrome de Crouzon, raquitismo, opsismodisplasia, picnodisostosis/enfermedad de Toluose-Lautrec, osteogénesis imperfecta y la enfermedad ósea individual más importante: osteoporosis.

35

Actualmente, la osteoporosis afecta a 1 de cada 5 mujeres de más de 50 años y a 1 de cada 2 hombres de más de 50 años. Para estos pacientes, está disponible un número de tratamientos, que en su mayoría abordan el aumento neto de la resorción ósea, es decir:

40

- terapia de sustitución hormonal (HRT)

- moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs)

45

- bifosfonatos

- calcitonina

50

Aunque estos tratamientos ralentizan la resorción ósea, no eliminan las fracturas porque no se sustituye el hueso perdido de manera suficiente. Las fracturas se detienen cuando la formación ósea aumenta en la medida suficiente. Por tanto, existe un gran interés en la identificación de mecanismos osteogénicos que conduzcan, por sí mismos, a la intervención terapéutica con anabolismo óseo como efecto. Actualmente, únicamente una terapia anabólica ósea ha alcanzado el mercado de la osteoporosis: la hormona paratiroide (PTH) 1-34. PTH muestra efectos anabólicos óseos cuando se administra de forma intermitente. El tratamiento con PTH es, no obstante, muy problemático debido a que es necesario inyectar este biofármaco diariamente en el paciente. Además, se ha observado la formación de tumores cuando se tratan animales con dosis elevadas. También, es un tratamiento muy caro.

55

Se ha aprobado otra clase de anabólicos óseos, las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), pero únicamente para mercados nicho, ya que existen desventajas en su uso como agentes terapéuticos para mejorar la consolidación ósea. Se han identificado receptores para las proteínas morfogenéticas óseas en muchos tejidos, y los propios BMPs se expresan en una gran variedad de tejidos con patrones espaciales y temporales específicos. Esto sugiere que BMPs pueden tener efectos sobre muchos tejidos diferentes del tejido óseo, limitando potencialmente su utilidad como agentes terapéuticos cuando se administran de forma sistémica.

60

65

Wkabayashi et al (2002. J. Bone Mineral Res, 17(2), 249-259) describe un ensayo en el que se ponen en contacto

células de precursor osteogénico con inhibidores de PDEs y se mide su efecto sobre, entre otros, la inducción de ALP y BMP-4, marcadores de la diferenciación osteoblástica. Los autores concluyen que PDE2, PDE3 y PDE4 favorecen la diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico y que los inhibidores selectivos sobre ellos pueden representar terapias para el tratamiento de enfermedades óseas metabólicas.

5 Por consiguiente, existe una continua necesidad de nuevas estrategias de tratamiento y compuestos (en particular anabólicos) que obvien uno o más de los inconvenientes de las estrategias de tratamiento actualmente disponibles.

Sumario de la invención

10 La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que induce diferenciación de células de mamíferos no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos, como se define en la reivindicación 1.

Descripción detallada

15 Definiciones:

El término "vehículo" significa un material no tóxico usado en la formulación de composiciones farmacéuticas para proporcionar un medio, volumen y/o forma usable a una composición farmacéutica. Un vehículo puede comprender uno o más de los citados materiales tales como un excipiente, estabilizador o una disolución acuosa con pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen ingredientes de tampón acuosos o sólidos que incluyen fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; amino ácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contra iones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN. TM., polietilenglicol (PEG), y PLURONICS.TM.

30 El término "compuesto" se usa en la presente memoria en el contexto de "compuesto de ensayo" o "compuesto candidato a fármaco" descrito en conexión con los ensayos de la presente invención. Como tal, estos compuestos comprenden compuestos orgánicos o inorgánicos, procedentes de fuentes sintéticas o naturales. Los compuestos incluyen compuestos inorgánicos u orgánicos tales como polinucleótidos, lípidos o análogos de hormonas que se caracterizan por pesos moleculares relativamente bajos. Otros compuestos de ensayo orgánicos biopoliméricos incluyen péptidos que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 40 amino ácidos y polipéptidos de gran tamaño que comprenden de aproximadamente 40 a aproximadamente 500 amino ácidos, tales como anticuerpos o conjugados de anticuerpos.

40 El término "contacto" o la expresión "poner en contacto" significan juntar al menos dos restos, ya sea en un sistema in vitro o un sistema in vivo.

El término "trastorno" o "enfermedad" significa la presentación evidente de síntomas (es decir, enfermedad) o la manifestación de indicadores clínicos anormales (por ejemplo, indicadores bioquímicos). Alternativamente, el término "enfermedad" se refiere a un riesgo genético o ambiental o propensión al desarrollo de dichos síntomas o indicadores clínicos anormales.

50 El término "endógeno" significa un material que produce naturalmente un mamífero. Por el contrario, la expresión no endógeno en este contexto significa que no se produce de forma natural por un mamífero (por ejemplo, y sin limitación, un humano) o un virus.

El término "expresión" comprende tanto expresión endógena como sobre-expresión por medio de transducción.

La expresión "ácido nucleico expresable" significa un ácido nucleico que codifica para una molécula de proteína, una molécula de ARN o una molécula de ADN.

55 El término "hibridación" significa cualquier proceso por medio del cual la hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de un apareamiento de bases. La expresión "complejo de hibridación" se refiere a un complejo formado entre dos secuencias de ácido nucleico por medio de la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias. Se puede formar un complejo de hibridación en disolución (por ejemplo C.sub.0t o análisis R.sub.0t) o se puede formar entre una secuencia de ácido nucleico presente en disolución y otra secuencia de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido (por ejemplo, papel, membranas, filtros, lascas, pernos o láminas de vidrio, o cualquier otro sustrato apropiado al cual se han fijado las células o sus ácidos nucleicos). La expresión "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación entre polinucleótidos y los polinucleótidos reivindicados. Se pueden definir las condiciones rigurosas por medio de la concentración de sal, la concentración de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, temperatura, y otras condiciones bien conocidas en la técnica. En particular, la reducción de la concentración de sal, el aumento de la concentración de formamida o el

aumento de la temperatura de hibridación pueden aumentar la rigurosidad.

El término "inhibir" o "inhibición", en relación al término "respuesta" significa que se disminuye o se evita una respuesta en presencia de un compuesto al contrario que en ausencia del compuesto.

5 La expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables" según se usa en la presente memoria significa los profármacos de los compuestos útiles en la presente invención, que son, dentro del alcance del juicio médico puro, apropiados para su uso en contacto con los tejidos de los pacientes con toxicidad inapropiada, irritación, respuesta alérgica adecuada a una relación razonable riesgo/beneficio, y eficaces para su uso pretendido de los compuestos de la invención. El término "profármaco" significa un compuesto que se transforma in vivo para dar lugar a un compuesto eficaz útil en la presente invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, hidrato o solvato. La transformación puede ocurrir por medio de varios mecanismos, tales como hidrólisis en sangre. Los compuestos que portan grupos metabólicamente escindibles tienen la ventaja de que pueden exhibir una biodisponibilidad mejorada como resultado de una solubilidad mejorada y/o una tasa de absorción otorgada al compuesto parental por medio de la presencia del grupo metabólicamente escindible, de manera que, dichos compuestos actúan como profármacos. Se proporciona una discusión global en Design of Prodrugs, H. Bundgaard, ed., Elsevier (1985); Methods in Ezymology; K. Widder et al., Ed., Academic Press, 42, 309-396 (1985); A Textbook of Drug Design and Development, Krogsgaard-Larsen y H. Bandaged, ed., Capítulo 5; "Design and Applications of Prodrugs", 113-191 (1991); Advanced Drug Delivery Reviews, H. Bundgaard, 8, 1-38, (1992); J. Pharm. Sci., 77, 285 (1988); Chem. Pharm. Bull., N. Nakeya et al, 32, 692 (1984); Pro-drugs as Novel Delivery Systems, T. Higuchi and V. Stella, 14, A.C.S. Symposium Series, and Bioreversible Carriers in Drug Design, E.B. Roche, ed., American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Un ejemplo de los profármacos es un profármaco de éster. "Profármaco de éster" significa un compuesto que es convertible in vivo por medios metabólicos (por ejemplo, por medio de hidrólisis) en un compuesto de inhibidor de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un profármaco de éster de un compuesto que contiene un grupo carboxi se puede convertir por medio de hidrólisis in vivo en el correspondiente grupo carboxi.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición ácidas inorgánicas u orgánicas, no tóxicas y sales de adición básicas, de compuestos de la presente invención. Se pueden preparar estas sales *in situ* durante el aislamiento final y purificación de compuestos útiles en la presente invención.

El término "polinucleótido" significa un ácido polinucleico, en forma de hebra individual o doble, y en la orientación de sentido o antisentido, ácidos polinucleicos complementarios que hibridan hasta un ácido polinucleico particular bajo condiciones rigurosas, y polinucleótidos que son homólogos en al menos aproximadamente 60 por ciento de sus pares de bases, y más preferentemente 70 por ciento de sus pares de bases están en común, del modo más preferido 90 por ciento, y en una realización especial 100 por ciento de sus pares de bases. Los polinucleótidos incluyen poli(ácidos ribonucleicos), poli(ácidos desoxirribonucleicos) y sus análogos sintéticos. Los polinucleótidos se describen por medio de secuencias que varían en cuanto a longitud, que varían desde aproximadamente 10 a aproximadamente 5000 bases, preferentemente desde aproximadamente 100 a aproximadamente 4000 bases, más preferentemente desde aproximadamente 250 a aproximadamente 2500 bases. Una realización de polinucleótido preferida comprende desde aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de longitud. Una realización especial de polinucleótido es el polirribonucleótido desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 22 nucleótidos, más comúnmente descrito como ARN intereferente pequeño (ARNsi). Otra realización especial son ácidos nucleicos con cadenas principales modificadas tales como ácido nucleico de péptido (PNA), polisiloxano, y 2'-O-(2-metoxi)etilfosforotioato, o que incluyen residuos de ácido nucleico de origen no natural, o uno o más sustituyentes de ácido nucleico, tales como metil-, tio-, sulfato, benzoil-, fenil-, amino-, propil-, cloro- y metanocarbanucleósidos, o una molécula indicadora para facilitar su detección.

El término "polipéptido" se refiere a proteínas, moléculas proteínicas, fracciones de péptidos de proteínas y oligopéptidos.

El término "solvato" significa una asociación física de un compuesto útil en la presente invención con una o más moléculas de disolvente. Esta asociación física incluye enlace de hidrógeno. En determinados casos el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando se incorporan una o más moléculas en la estructura de red cristalina del sólido cristalino. "Solvato" engloba solvatos tanto en fase de disolución como aislables. Solvatos representativos incluyen hidratos, etanolatos y metanolatos.

El término "sujeto" incluye humanos y otros mamíferos.

La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa esa cantidad de un compuesto o agente que muestra la respuesta biológica o médica de un sujeto que está siendo tratado por un doctor u otro facultativo. En particular, con respecto al tratamiento de un trastorno de tipo óseo, se pretende que la expresión "cantidad eficaz" signifique esa cantidad de un compuesto o agente que muestra la respuesta biológica o médica de un sujeto que está siendo tratado por un doctor u otro facultativo. En particular, con respecto al tratamiento de un trastorno que implica una disminución local sistémica de la densidad ósea media, se pretende que la expresión "cantidad eficaz" signifique la cantidad eficaz de un compuesto o agente que generará un aumento biológicamente significativo de la

densidad ósea media.

5 El término "tratar" significa una intervención llevada a cabo con la intención de evitar el desarrollo o alterar la patología, y de este modo aliviar, un trastorno o enfermedad, incluyendo uno o más síntomas de dicho trastorno o enfermedad. Por consiguiente, "tratar" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan el tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que se pretende evitar el trastorno. El término relacionado "tratamiento", según se usa en la presente memoria, se refiere al acto de tratar un trastorno, síntoma o enfermedad, tal y como se ha definido el término "tratar" anteriormente.

10 "Células de mamíferos no diferenciadas" son células pluripotentes que están en un estadio temprano de especialización, es decir, células que todavía no tienen su función final y que se pueden inducir para que formen cualquier tipo celular dado. En particular, estas son células que no se han diferenciado todavía en los osteoclastos u osteoblastos de células óseas específicas. Dichas células pluripotentes son células especialmente sanguíneas y células presentes en la médula ósea, así como células procedentes de tejido adiposo. Además, la presente
15 invención contempla células que se pueden diferenciar para dar lugar a células de precursor mesenquimales, tales como, por ejemplo, hemocitoblastos totipotentes tales como hemocitoblastos embrionarios.

La presente invención se refiere a un método para identificar un compuesto que induce diferenciación de células de mamíferos no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos como se define en la reivindicación 1. Una "propiedad de polipéptido-compuesto" es un fenómeno medible escogido por la persona experta en la técnica. Una propiedad medible descrita puede ser, por ejemplo, la afinidad de enlace del polipéptido por un dominio de péptido y el nivel de uno cualquiera de un número de niveles de marcador bioquímico de diferenciación de osteoblastos. Por ejemplo, la diferenciación de osteoblastos se puede medir por medio del nivel de las enzimas que se inducen durante el proceso de diferenciación, tal como la fosfatasa alcalina, colágeno de tipo 1, osteocalcina y osteopontina. Se puede
20 medir la actividad de fosfatasa alcalina por medio de adición de una disolución de heptafosfato de metilumbeliferilo (MUP) (Sigma) a las células. Se mide la fluorescencia generada tras la escisión del sustrato de MUP por medio de la actividad AP en un lector de placa de fluorescencia (Fluostar, BMG).

Dependiendo de la elección del experto en la técnica, se puede diseñar el presente método de ensayo para que
30 funcione como series de mediciones, cada una de las cuales está diseñada para determinar si el compuesto candidato a fármaco está actuando de hecho sobre el polipéptido, para inducir de este modo la diferenciación de las células no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos. Por ejemplo, puede resultar necesario, pero no suficiente, un ensayo diseñado para determinar la afinidad de enlace de un compuesto con el polipéptido, o su fragmento, con el fin de adivinar si el compuesto de ensayo sería útil para aumentar la densidad ósea media cuando se administra a un sujeto. Sin embargo, dicha información de enlace sería útil para identificar un conjunto de compuestos de ensayo
35 para su uso en un ensayo que mediría una propiedad diferente, siguiendo el mecanismo bioquímico, tal como la mineralización ósea, sometido a ensayo midiendo la cantidad de calcio depositado. Se puede diseñar dicho segundo ensayo para confirmar que el compuesto de ensayo, que tiene afinidad de enlace por el polipéptido, en realidad induce la diferenciación de células no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos. Se deben poner en práctica los controles apropiados para obtener seguridad frente a lecturas de falsos positivos.

Se piensa que el orden de la toma de estas mediciones no es crítico para la práctica de la presente invención, que se puede poner en práctica en cualquier orden. Por ejemplo, en primer lugar se puede llevar a cabo un ensayo de detección de un conjunto de compuestos para los cuales no se conoce información relativa a la afinidad de enlace
45 del compuesto por el polipéptido. Alternativamente, se puede detectar un conjunto de compuesto identificados como que presentan afinidad de enlace por un dominio de polipéptido, o una clase de compuestos identificados como inhibidor del polipéptido. No obstante, para que el presente ensayo sea significativo para el uso último de los compuestos candidatos a fármaco, es necesaria una medición de los niveles de fosfatasa alcalina o de la mineralización ósea. No obstante, los estudios de validación que incluyen controles, y mediciones de la afinidad de
50 enlace por los polipéptidos de la invención no son útiles para identificar un compuesto útil en alguna aplicación terapéutica o de diagnóstico.

La afinidad de enlace del compuesto con el polipéptido se puede medir por métodos conocidos en la técnica, tales como biosensores de resonancia de plasmón superficial (Biacore), por medio de análisis de enlace de saturación
55 con un compuesto marcado (por ejemplo, análisis de Scatchard y Lindmo), por medio de espectrofotómetro UV diferencial, ensayo de polarización de fluorescencia, sistemas Lector de Placa de Formación de Imágenes Fluorométricas (FLIPR®), transferencia de energía de resonancia de fluorescencia y transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia. También se puede expresar la afinidad de enlace de los compuestos en forma de constante de disociación (Kd) o como IC50 o EC50. El IC50 representa la concentración de un compuesto que se requiere para una inhibición de un 50 % de la unión de otro ligando al polipéptido. El EC50 representa la
60 concentración requerida para obtener un 50 % del efecto máximo en cualquier ensayo que mida la función del receptor. La constante de disociación, Kd, es una medida de la bondad de enlace entre el ligando y el polipéptido, es equivalente a la concentración de ligando necesaria para saturar exactamente la mitad de los sitios de enlace del polipéptido. Compuestos con una afinidad de enlace elevada tienen valores de EC50, IC50 y Kd bajos, es decir, dentro del intervalo de 100 nM hasta 1 pM; una afinidad de enlace de moderada a baja se refiere a valores de EC50,
65 IC50 y Kd elevados, es decir, en el intervalo micromolar.

Una célula hospedadora que expresa el polipéptido puede ser una célula con expresión endógena o una célula que sobre-expresa el polipéptido por medio de transducción. Cuando la expresión endógena del polipéptido no es suficiente para determinar una línea de base que se pueda medir fácilmente, se pueden usar células hospedadoras que sobre-expresen el polipéptido. En dicho ensayo celular, se puede medir la actividad biológica del polipéptido por medio de la siguiente producción de fosfatasa alcalina ósea (BAP) o mineralización ósea.

Se describe un método para identificar un compuesto que induzca diferenciación de células de mamíferos no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos, que comprende:

(a) poner en contacto un compuesto con un polipéptido que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID No: 194-309;

(b) determinar la afinidad de enlace del compuesto por el polipéptido;

(c) poner en contacto una población de células de mamífero que expresan dicho polipéptido con el compuesto que exhibe una afinidad de enlace de al menos 10 micromolar; e

(d) identificar el compuesto que induce la diferenciación de dichas células no diferenciadas.

Con fines de alto rendimiento, se pueden usar las bibliotecas de compuestos tales como las bibliotecas de fragmentos de anticuerpos, bibliotecas de muestra de péptidos y bacteriófagos, bibliotecas de péptidos (por ejemplo, LOPAP™, Sigma Aldrich), bibliotecas de lípidos (BioMol), bibliotecas de compuestos sintéticos (por ejemplo, LOPAC™, Sigma Aldrich) o bibliotecas de compuestos naturales (Specs, TimTec.).

Los compuestos candidatos a fármacos pueden ser compuestos de bajo peso molecular. Los compuestos de bajo peso molecular, es decir, con un peso molecular de 500 Dalton o menos, son susceptibles de presentar una buena absorción y permeabilidad en los sistemas biológicos y, por consiguiente, son más susceptibles de ser candidatas fármacos satisfactorios que los compuestos que tienen un peso molecular por encima de 500 Dalton. Los péptidos comprenden otra clase de compuestos candidatos a fármacos. Los péptidos pueden ser excelentes candidatos a fármacos y existen múltiples ejemplos de péptidos comercialmente valiosos tales como hormonas de fertilidad e inhibidores de la agregación de plaquetas. Los compuestos naturales son otra clase preferida de compuesto candidato a fármaco. Dichos compuestos se encuentran en las fuentes naturales y se extraen de ellas, y posteriormente se pueden sintetizar. Los lípidos son otra clase de compuesto candidato a fármaco.

Otra clase de compuestos candidatos a fármacos es un anticuerpo. La presente divulgación describe anticuerpos destinados contra los dominios extracelulares de los polipéptidos de la invención. Estos anticuerpos deberían unirse específicamente a uno o más dominios extracelulares de los polipéptidos, o como se describe a continuación, ser sometidos a estudio técnico para la producción endógena con el fin de unirse a un dominio de polipéptido intracelular. Estos anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o anticuerpos policlonales. Se incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena individual y humanizados, así como también fragmentos de FAb y los productos de biblioteca de expresión de FAb, y fragmentos Fv y los productos de biblioteca de expresión de Fv.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos policlonales se pueden usar en la práctica de la invención. El experto en la técnica conoce métodos de preparación de anticuerpos policlonales. Se pueden aumentar los anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, por medio de una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente de inmunización y/o el adyuvante se inyectan en el mamífero por medio de inyecciones intraperitoneales o subcutáneas. Los anticuerpos también se pueden generar frente a un polipéptido o proteínas intactas, o frente a un fragmento tal como sus péptidos de dominio extracelulares, derivados que incluyen conjugados, u otro epítipo de la proteína o polipéptido, tal como un polipéptido intercalado en una membrana celular, o una biblioteca de regiones variables de anticuerpo, tal como una biblioteca de muestra de bacteriófagos.

Puede resultar útil conjugar el agente de inmunización a una proteína conocida para que sea inmunogénico en el mamífero objeto de inmunización. Ejemplos de proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitarse a, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (Lípido A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales se pueden "humanizar" para evitar que el hospedador genere una respuesta inmunológica a los anticuerpos. Un "anticuerpo humanizado" es uno en el que las regiones determinantes complementarias (CDRs) y/o otras partes del marco de dominio variable ligero y/o pesado proceden de inmunoglobulina de origen no humano, pero las partes restantes de la molécula proceden de una o más inmunoglobulinas de origen humano. Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos caracterizados por una cadena pesada humanizada asociada a una cadena ligera no modificada de donador o aceptor o a una cadena

ligera quimérica, o viceversa. La humanización de los anticuerpos se puede conseguir por medio de métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Mark y Padlan, (1994) "Capítulo 4. Humanization of Monoclonal Antibodies", The Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113, Springer-Verlag, New York). Se pueden usar animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados.

5 Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo bibliotecas de muestra de bacteriófagos (Hoogenboom y Winter, (1991), J. Mol. Biol. 227:381-8; Marks et al. (1991). J. Mol. Biol. 222:581-97). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al. (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77; Boerner, et al (1991). J. Immunol., 147(1): 86-95).

15 Se pueden adaptar las técnicas conocidas en la técnica para la producción de anticuerpos de cadena individual para producir anticuerpos de cadena individual para polipéptidos y proteínas de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de una cadena ligera de inmunoglobulina y de una cadena pesada modificada. Generalmente, se trunca la cadena pesada en cualquier punto de la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, se sustituyen los residuos de cisteína relevantes por otro residuo de amino ácido o se eliminan para evitar la reticulación.

20 Los anticuerpos bioespecíficos son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de enlace para al menos dos antígenos diferentes y preferentemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor.

25 Los métodos para preparar anticuerpos bioespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de los anticuerpos bioespecíficos está basada en la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes (Milstein y Cuello, (1983) Nature 305:537-9). Debido a la ordenación aleatoria de las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura bioespecífica correcta. Normalmente, las etapas de cromatografía de afinidad logran la purificación de la molécula correcta. Se describen procedimientos similares en Trauneecker, et al. (1991) EMBO J. 10:3655-9.

35 El método de ensayo comprende usar un compuesto candidato a fármaco identificado por presentar afinidad de enlace por el presente polipéptido.

40 Se divulga un agente para inducir la diferenciación de células de mamíferos no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos, seleccionado entre el grupo que consiste en polinucleótido antisentido, una ribozima y ARN interferente pequeño (ARNsi), en el que dicho agente comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a, o sometida a estudio técnico a partir de, una secuencia de polinucleótido de origen natural que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de amino ácido seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 194-309. Se puede seleccionar el agente entre el grupo que consiste en un polinucleótido antisentido, una ribozima y un ARN interferente pequeño (ARNsi), en el que dicho agente comprende una secuencia de amino ácidos complementaria a, o sometida a estudio técnico a partir de, una secuencia de polinucleótido de origen natural que codifica el presente polipéptido.

45 Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender una secuencia que contiene desde aproximadamente 17 hasta aproximadamente 100 nucleótidos o los oligonucleótidos antisentido comprenden desde aproximadamente 18 hasta aproximadamente 30 nucleótidos.

50 Los ácidos nucleicos antisentido pueden ser oligonucleótidos y pueden consistir enteramente en desoxirribonucleotidos, desoxirribonucleotidos modificados o alguna combinación de ambos. Los ácidos nucleicos antisentido pueden ser oligonucleótidos sintéticos. Los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente, si se desea, para mejorar la estabilidad y/o la selectividad. Debido a que los oligonucleótidos son susceptibles de degradación por medio de las nucleasas intracelulares, las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de un grupo de azufre para sustituir al oxígeno libre del enlace fosfodiéster. Esta modificación se denomina un enlace fosforotioato. Los oligonucleótidos antisentido de fosforotioato son solubles en agua, polianiónicos y resistentes a nucleasas endógenas. Además, cuando un oligonucleótido antisentido de fosforotioato se hibrida en su sitio diana, la dupla ARN-ADN activa la ribonucleasa de enzima endógena (RNasa) H, que escinde el componente de ARNm de la molécula híbrida.

60 Además, se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido con enlaces de fosforamidita y poliamida (péptido). Estas moléculas deberían ser muy resistentes a la degradación de nucleasa. Además, se pueden añadir grupos químicos al carbono 2' del resto de azúcar y al carbono 5 (C-5) de las pirimidinas para mejorar la estabilidad y facilitar la unión del oligonucleótido antisentido a su sitio diana. Las modificaciones pueden incluir 2'-deoxi-, O-pentoxi-, O-propoxi-, O-metoxi-, fluoro-, metoxietoxi fosforotioatos, bases modificadas, así como también otras modificaciones conocidas por los expertos en la técnica.

Otro tipo de agente inhibidor de expresión que reduce los niveles de polipéptidos de la invención son las ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas (enzimas de ARN) que tienen dominios de enlace de sustrato y catalíticos separados. La secuencia de enlace de sustrato combina por medio de complementariedad de nucleótido y, posiblemente, por medio de interacciones de enlace de hidrógeno con su secuencia diana. La parte catalítica se escinde del ARN diana en un sitio específico. El dominio de sustrato de una ribozima se puede someter a estudio técnico para dirigirlo a una secuencia de ARNm específico. La ribozima reconoce y posteriormente se une a un ARNm diana a través de emparejamiento de bases complementarias. Una vez que está unido al sitio diana correcto, la ribozima actúa enzimáticamente para cortar el ARNm diana. La escisión del ARNm por parte de la ribozima destruye su capacidad de dirigir la síntesis del polipéptido correspondiente. Una vez que la ribozima ha producido la escisión de su secuencia diana, se libera y se puede unir repetidamente y provocar la escisión de otros ARNm.

Las formas de ribozima incluyen un motivo de cabeza de martillo, un motivo de horquilla de pelo, un virus de hepatitis delta, un motivo de intrón de grupo I o ARN RNasaP (en asociación con una secuencia de guía de ARN) o un motivo de Neurospora VS ARN. Los ribozimas que poseen una estructura de horquilla o de cabeza de martillo se preparan fácilmente ya que estas moléculas de ARN catalíticas se pueden expresar en el interior de células procedentes de promotores eucariotas (Chen, et al., (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:4581-9). Se puede expresar una ribozima de la presente invención en células eucariotas a partir del vector de ADN apropiado. Si se desea, se puede aumentar la actividad de la ribozima por medio de su liberación a partir de la fracción transcrita principal por medio de una segunda ribozima (Ventura, et al., (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:3249-55).

Las ribozimas se pueden sintetizar químicamente por medio de combinación de un oligodesoxirribonucleótido con un dominio catalítico de ribozima (20 nucleótidos) flanqueado por secuencias que hibridan con el ARNm diana tras la transcripción. Se amplifica el oligodesoxirribonucleótido por medio del uso de secuencias de unión de sustrato como primeros. Se clona el producto de amplificación para dar lugar a un vector de expresión eucariota.

Los ribozimas se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en el interior de ADN, ARN o vectores víricos. La transcripción de las secuencias de ribozimas está conducida por un promotor de ARN polimerasa I eucariota (pol I), ARN polimerasa II (pol II), o ARN polimerasa III (pol III). Las fracciones transcritas de los promotores pol II o pol III se expresan a niveles elevados en todas las células; los niveles de un promotor dado pol II en un tipo celular dado dependen de las secuencias reguladoras de genes cercanos. También se usan los promotores de ARN polimerasa procariotas, con la condición de que la enzima ARN polimerasa procariota se exprese en las células apropiadas (Gao y Huang, (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:2867-72). Se ha demostrado que las ribozimas expresadas a partir de estos promotores pueden funcionar en células de mamíferos (Kashani-Sabet, et al. (1992) *Antisense Res. Dev.* 2:3-15).

Un agente inhibidor puede ser ARN interferente pequeño (ARNsi). ARNsi actúa de mediador en el proceso post-transcripcional de silenciado génico por parte del ARN de doble hebra (ARNds) que es homólogo en cuanto a la secuencia al ARN silenciado. El ARNsi puede comprender hebras sentido y antisentido que son 100 por ciento complementarias unas con otras y con la secuencia de polinucleótidos diana. Preferentemente, el ARNsi además comprende una región de bucle que une la hebra sentido y la hebra antisentido.

El polinucleótido de molécula de ARNsi de hebra individual de auto-complementación puede comprender una parte de sentido y una parte de antisentido conectadas por medio de un agente de enlace de región de bucle. La secuencia de región de bucle puede tener una longitud de 4-30 nucleótidos, tal como una longitud de 5-15 nucleótidos y una longitud de 8 nucleótidos. La secuencia de agente de unión puede ser GTTTGCTATAAC. Los ARNsi de hebra individual de auto-complementarios forman bucles con forma de horquilla y son más estables que ARNds ordinarios. Además, se producen más fácilmente a partir de vectores.

De forma análoga a ARN, se puede modificar el ARNsi para confirmar la resistencia a la degradación nucleolítica, o para mejorar la actividad, o para mejorar la distribución celular, o para mejorar la captación celular, pudiendo consistir dichas modificaciones en enlaces de internucleósido modificados, bases de ácido nucleico modificadas, azúcares modificados y/o un enlace químico de ARNsi a uno o más restos o conjugados. Las secuencias de nucleótido están seleccionadas de acuerdo con los reglas de diseño de ARNsi que proporcionan una reducción mejorada de las secuencias diana en comparación con las secuencias de nucleótido que no cumplen estas reglas de diseño de ARNsi (Para una discusión sobre estas reglas y ejemplos de preparación de ARNsi, el documento WO 2004094636, publicado el 4 de noviembre de 2004, y el documento UA 20030198627).

Se divulgan composiciones y métodos que usan dichas composiciones, que comprenden un vector de expresión de ADN capaz de expresar un polinucleótido capaz de inducir diferenciación de células no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos y se ha descrito anteriormente como agente de inhibición de expresión.

El polinucleótido que expresa el agente de inhibición de expresión puede incluirse dentro de un vector. De manera operativa, el ácido polinucleico se une a señales que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico y se introduce en el interior de una célula que utiliza, preferentemente, estructuras de vector recombinante, que expresarán el ácido nucleico antisentido una vez que se introduce el vector en el interior de la célula. Una variedad

de sistemas de base vírica está disponible, incluyendo sistemas de vectores adenovíricos, retrovíricos, víricos adeno-asociados, lentivíricos, víricos de herpes simple o sendavíricos, y todos ellos se pueden usar para introducir y expresar la secuencia de polinucleótido para los agentes de inhibición de la expresión en las células diana.

5 Los vectores víricos usados son de replicación incompleta. Dichos vectores de replicación incompleta normalmente envuelven al menos una región que es necesaria para la replicación del virus en la célula infectada. Estas regiones bien se pueden eliminar (en su totalidad o en parte) o bien se pueden convertir en no funcionales por medio de una técnica conocida por el experto en la técnica. Estas técnicas incluyen la retirada total, sustitución, eliminación parcial o adición de una o más bases a una región esencial (para la replicación). Dichas técnicas se pueden llevar a cabo in vitro (sobre el ADN aislado) o in situ, usando las técnicas de manipulación genética o por medio de tratamiento con agentes mutagénicos. El virus con replicación incompleta puede conservar las secuencias de su genoma, que son necesarias para la formación de la cápside, las partículas víricas.

15 El elemento vírico puede proceder de un adenovirus. El vehículo puede incluir un vector adenovírico envuelto en el interior de una cápside adenovírica, o una de sus partes funcionales, derivados y/o análogos. La biología del adenovirus también se conoce comparativamente bien a nivel molecular. Se han desarrollado y continúan desarrollándose muchas herramientas para vectores adenovíricos, haciendo de este modo que la cápside adenovírica sea un vehículo preferido para la incorporación a una biblioteca. Un adenovirus es capaz de infectar a una amplia variedad de células. No obstante, diferentes serotipos adenovíricos tienen diferentes preferencias por las células. Para combinar y ampliar la población celular diana en la que puede entrar una cápside adenovírica, el vehículo puede incluir proteínas fibrosas de al menos dos adenovirus.

25 El ácido nucleico procedente de un adenovirus puede incluir el ácido nucleico que codifica una proteína posterior adenovírica o una de sus partes funcionales, derivados y/o análogos. De manera favorable, se puede usar la proteína posterior adenovírica, por ejemplo, una proteína fibrosa adenovírica, para dirigir el vehículo a una determinada célula o para inducir una administración mejorada del vehículo a la célula. El ácido nucleico procedente de un adenovirus puede codificar para básicamente todas las proteínas posteriores adenovíricas, permitiendo la formación de cápsides adenovíricas enteras o sus partes funcionales, análogos y/o derivados. Preferentemente, el ácido nucleico procedente de un adenovirus incluye el ácido nucleico que codifica adenovirus E2A o una de sus partes funcionales, derivados y/o análogos. El ácido nucleico procedente de un adenovirus incluye el ácido nucleico que codifica al menos una proteína de región-E4 o una de sus partes funcionales, derivados y/o análogos, que facilita, al menos en parte, la replicación de un ácido nucleico procedente de adenovirus en la célula. Los vectores adenovíricos usados en los ejemplos de esta solicitud son un ejemplo de los vectores útiles.

35 Los retrovirus son virus integradores que infectan células en división, y su estructura se conoce en la técnica. Se pueden construir vectores retrovíricos a partir de diferentes tipos de retrovirus, tales como, MoMuLV ("virus de leucemia Moloney murina" MSV (virus de sarcoma de Moloney murino"), HaSV ("virus de sarcoma de Harvey"); SNV ("virus de necrosis esplénica"); RSV ("virus de sarcoma de Rous") y virus de Friend. También se pueden usar los sistemas de vectores lentivíricos. Los sistemas retrovíricos y los sistemas de virus de herpes pueden ser vehículos para la transfección de células neuronales.

45 Los virus AAV son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que se integran, de una manera estable y en un sitio específico, en el interior del genoma de las células infectadas. Son capaces de infectar un amplio espectro de células sin inducir efecto alguno sobre la proliferación celular, la morfología o la diferenciación, y no parece que estén implicados en patologías humanas.

En la construcción del vector, los agentes de polinucleótidos divulgados pueden unirse a una o más regiones reguladoras. Las regiones reguladoras incluyen promotores, y pueden incluir agentes de mejora, supresores, etc.

50 Los promotores que se pueden usar en los vectores de expresión incluyen tanto promotores constitutivos como promotores regulados (inducibles). Los promotores pueden ser procariotas o eucariotas dependiendo del hospedador. Entre los promotores procariotas (incluyendo los bacteriófagos) útiles para la práctica de la presente invención están lac, lacZ, T3, T7, lambda P. sub.r, P.sub.1, y promotores trp. Entre los promotores eucariotas (incluyendo los víricos) están promotores ubicuos (por ejemplo, HPRT, vimentina, actina, tubulina), promotores de filamento intermedios (por ejemplo, desimina, neurofilamentos, queratina, GFAP), promotores génicos terapéuticos (por ejemplo, de tipo MDR, CFTR, factor VIII), promotores específicos de tejido (por ejemplo, promotor de actina en células de músculo liso, o promotores Flt y Flk activos en células endoteliales), que incluyen regiones de control transcripcionales animales, que exhiben especificidad tisular y que se han utilizado en animales transgénicos: región de control génica de elastasa I que es activa en células ácinares pancreáticas (Swift, et al., (1984) Cell 38:639-46; Ornitz, et al., (1986) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald (1987) Hepatology 7:425-515); región de control génica de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, (1985), Nature 315:115-22), región de control génica de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl, et al., (1984) Cell 38:647-58; Adames, et al., (1985) Nature 318:533-8; Alexander, et al., (1987) Mol. Cell. Biol. 7:1436-44), región de control de virus tumoral mamario de ratón que es activo en células de testículo, pecho, linfoides y mama (Leder, et al., (1986) Cell 45:485-95), región de control génica de albúmina que es activa en hígado (Pinkert, et al., (1987) Genes and Devel. 1:268-76), región de control génica de alfa-fetoproteína que es activa en hígado (Krumlauf, et al.,

(1985) *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer, et al., (1987) *Science* 235:53-8), región de control génico de alfa-1-antitripsina que es activa en hígado (Kelsey, et al., (1987), *Genes and Devel.*, 1:161-71), región de control génico de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram, et al., (1985) *Nature* 315:338-40; Kollias et al., (1986) *Cell* 46:89-94) región de control génico de proteína básica de mielina que es activa en células de oligodendrocito en el cerebro (Readhead, et al., (1987) *Cell* 48:703-12), región de control génico de cadena-2 ligera de miosina que es activa en musculo estriado (Sani, (1985) *Nature* 314:283-6) y región de control génico de hormonal de liberación gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason, et al., (1986) *Science* 234:1372-8).

Otros promotores que se pueden usar incluyen promotores que se activan preferentemente en células en división, promotores que responden a un estímulo (por ejemplo, el receptor de hormona esteroidea, un receptor de ácido retinoico), moduladores transcripcionales regulados por tetraciclina, citomegalovirus inmediato-temprano, LTR retroviral, metalotioneina, SV-40, E1a y promotores MLP.

Los sistemas de vectores adicionales incluyen sistemas que no son víricos que facilitan la introducción de agentes de polinucleótido en el interior del paciente. Por ejemplo, se puede introducir un vector de ADN que codifica una secuencia deseada in vivo por medio de lipofección. Se pueden usar lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades encontradas con las transfecciones mediadas por liposomas, con el fin de preparar liposomas para transfección in vivo de un gen que codifica un marcador (Felgner, et al., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7), véase Mackey, et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8027-31; Ulmer, et al. (1993) *Science* 259:1745-8). El uso de lípidos catiónicos puede favorecer el encapsulado de ácidos nucleicos cargados negativamente, y también puede favorecer la fusión con membranas celulares negativamente cargadas (Felgner y Ringold, (1989) *Nature* 337:387-8). Los compuestos lipídicos particularmente útiles y las composiciones para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las publicaciones de patente internacional WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la patente de EE.UU. N° 5.459.127. El uso de lipofección para introducir genes exógenos en el interior de órganos específicos in vivo tiene ciertas desventajas prácticas y el hecho de dirigir la transfección a tipos celulares específicos sería particularmente ventajoso en un tejido con heterogeneidad celular, por ejemplo, páncreas, hígado, riñón y cerebro. Los lípidos se pueden acoplar químicamente a otras moléculas con el fin de dirigirlos. Los péptidos diana, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y las proteínas por ejemplo, anticuerpos, o moléculas que no son péptidos se podrían acoplar químicamente a liposomas. Otras moléculas también son útiles para facilitar la transfección de un ácido nucleico in vivo, por ejemplo, un oligopéptido catiónico (por ejemplo la publicación de patente internacional WO 95/21931), péptidos procedentes de proteínas que se unen a ADN (por ejemplo la publicación de patente internacional WO 96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo la publicación de patente internacional WO 95/21931).

También es posible introducir un vector de ADN in vivo en forma de plásmido de ADN desnudo (véanse las patentes de EE.UU. Nos 5.693.622, 5.589.466 y 5.580.859). Los vectores de ADN desnudos con fines terapéuticos se pueden introducir en el interior de las células hospedadoras deseadas por medio de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, dextrano DEAE, precipitación con fosfato de calcio, uso de pistola génica o el uso de un transportador de vector de ADN (véase, por ejemplo, Wilson, et al., (1992) *J. Biol. Chem.* 267:963-7; Wu y Wu, (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14621-4; Hartmut, et al., solicitud de patente canadiense N°. 2.012.311, presentada el 5 de marzo de 1990; Williams, et al (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-30). También se pueden usar enfoques de administración de ADN mediado por receptor (Curiel, et al. (1992) *Hum. Gene Ther.* 3:147-54; Wu y Wu, (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-32).

También se describe una composición farmacéutica mejoradora de la formación ósea que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente como se ha descrito anteriormente, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otra composición farmacéutica puede ser para el tratamiento o la prevención de una enfermedad que implica una disminución sistémica o local de la densidad ósea media, o una susceptibilidad a la enfermedad, que comprende una cantidad eficaz mejoradora de la formación ósea de antagonistas o agonistas inversos de los polipéptidos de la invención y de sus sales farmacéuticamente aceptables, hidratos, solvatos o profármacos, mezclada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede ser una composición, puede ser un sólido, líquido, gel, u otra forma, en la que el compuesto, polinucleótido, vector y anticuerpo de la invención se mantengan en forma activa, por ejemplo, en una forma capaz de llevar a cabo actividad biológica. Por ejemplo, un compuesto de la invención tendría actividad agonista o agonista inversa sobre el polipéptido; un ácido nucleico sería capaz de replicarse, trasladar un mensaje o hibridar a un ARNm complementario del polipéptido; un vector sería capaz de transfectar una célula diana y de la expresión de un anticuerpos antisentido, ribozima o ARNs como se ha descrito anteriormente; un anticuerpo se uniría a un dominio de polipéptido.

Dichas composiciones se pueden formular para administración por las rutas tópica, oral, parenteral, intranasal, subcutánea e intraocular. Administración parenteral significa que incluye inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intra-arterial o técnicas de infusión. Se puede administrar la composición por vía parenteral en formulación de dosificación unitaria que contiene excipientes fisiológicamente aceptables, no tóxicos, bien conocidos y normalizados, adyuvantes y vehículos según se desee.

Las composiciones farmacéuticas para administración oral se pueden formular usando excipientes farmacéuticamente aceptables conocidos en la técnica en dosificaciones apropiadas para administración oral. Dichos excipientes permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para ingestión por parte del paciente. Se pueden preparar composiciones farmacéuticas para uso oral por medio de la combinación de compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente molienda de la mezcla resultante, y procesado de la mezcla de gránulos, tras adición de las sustancias auxiliares apropiadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Excipientes apropiados son sustancias de relleno de carbohidrato o de proteína, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, almidón tal como de maíz, trigo, arroz o patata, u otras plantas; celulosa, tal como metil celulosa, hidropropilmetil-celulosa, o carboximetil-celulosa de sodio; gomas que incluyen goma arábiga y goma de tragacanto; y proteínas tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes de desintegración o de solubilización, tales como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico, o una de sus sales, tal como alginato de sodio. Se pueden usar núcleos de grageas junto con revestimientos apropiados, tal como disoluciones de azúcar concentradas, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de goma laca y disolventes orgánicos apropiados y mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de gragea para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, por ejemplo, la dosificación.

Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar oralmente incluyen cápsulas de ajuste suave de gelatina, así como también cápsulas selladas blandas de gelatina y un revestimiento, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste suave pueden contener principios activos con sustancia de relleno o aglutinante, tal como lactosa o almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, se pueden disolver los compuestos activos o se pueden suspender en líquidos apropiados, tal como aceites grasos, líquido, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

Las preparaciones inyectables estériles pueden ser una disolución o suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico. Ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables son disoluciones salinas, disoluciones salinas tamponadas, disoluciones salinas isotónicas (por ejemplo, fosfato de monosodio y disodio, cloruro de sodio, potasio; calcio o magnesio, o mezclas de dichas sales), disolución de Ringer, dextrosa, agua, agua estéril, glicerol, etanol y sus combinaciones. Se emplean 1,3-butanodiol y aceites fijados estériles de manera conveniente como disolventes o medios de suspensión. Se puede emplear cualquier aceite fijo suave que incluye mono- o di-glicéridos. También se pueden usar ácidos grasos tales como ácido oleico en la preparación de formulaciones inyectables.

El medio de la composición también puede ser un hidrogel, que se prepara a partir de cualquier homo- o heteropolímero no citotóxico o biocompatible, tal como un polímero de ácido poliacrílico hidrófilo que puede actuar como esponja de absorción de fármaco. Algunos de ellos, tal como, en particular, los obtenidos a partir de óxido de etileno y/o propileno se encuentran comercialmente disponibles. Se puede depositar directamente un hidrogel sobre la superficie del tejido objeto de tratamiento, por ejemplo durante una intervención quirúrgica.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un vector vírico recombinante con replicación incompleta que codifica el agente inhibidor de polinucleótido de la presente invención y un agente de mejora de la transfección, tal como un poloxámero. Un ejemplo de poloxámero es Poloxamer 407, que está comercialmente disponible (BASF, Parsippany, N.J.) y es un poliol biocompatible y no tóxico. Se puede depositar directamente un poloxámero impregnado con virus recombinantes sobre la superficie del tejido objeto de tratamiento, por ejemplo durante una intervención quirúrgica. El poloxámero posee esencialmente las mismas ventajas que el hidrogel, aunque tiene menor viscosidad.

Los agentes inhibidores de expresión activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por medio de polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16ª edición Osol, A. Ed.

Se pueden generar preparaciones de liberación prolongada. Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semi-permeables de polímeros hidrófobos que contienen el anticuerpo, estando las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. Nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables formadas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como acetato de vinilo-etileno y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas durante 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o se pueden agregar como resultado de la

exposición a humedad a 37 °C, dando como resultado la pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la capacidad inmunógena. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace intermolecular S-S a través de un intercambio de tio-disulfuro, se puede conseguir la estabilización por medio de la modificación de los residuos de sulfhidrilo, a través de la lipofilización a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

Como se ha definido anteriormente, dosis terapéuticamente eficaz significa esa cantidad de proteína, polinucleótido, péptido o sus anticuerpos, agonistas o antagonistas, que mejora los síntomas o la enfermedad. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos se puede determinar por medio de procedimientos farmacéuticos normalizados en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en 50 % de la población) y LD50 (la dosis letal para el 50 % de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos con respecto a efectos terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que exhiben índices terapéuticos elevados. Se usan los datos obtenidos de ensayos con cultivos celulares y estudios animales para formular un intervalo de dosificación para uso humano. Preferentemente, la dosificación de dichos compuestos se encuentra dentro del intervalo de concentraciones de circulación que incluyen el ED50 con escasa o nula toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, la sensibilidad del paciente, y la ruta de administración.

Para cualquier compuesto, se puede estimar inicialmente la dosis terapéuticamente eficaz bien en ensayos de cultivos celulares como en modelos animales, normalmente en ratones, conejos, perros o cerdos. También se usa el modelo animal para lograr el intervalo de concentración deseado y la ruta de administración. Posteriormente, se puede usar dicha información para determinar las dosis útiles y las rutas de administración en humanos. La dosificación exacta se escoge por parte del facultativo individual a la vista del paciente objeto de tratamiento. Se ajustan la dosificación y la administración para proporcionar los niveles suficientes de resto activo o para mantener el efecto deseado. Factores adicionales que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado de la enfermedad, edad, peso y sexo del paciente; dieta, duración deseada del tratamiento, método de administración, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármaco, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. Se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de acción larga cada 3 ó 4 días, o una vez cada dos semanas dependiendo de la tasa de semi-vida y de la tasa de eliminación de la formulación particular.

Se pueden administrar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención a un sujeto por medio de una variedad de métodos. Se pueden añadir directamente a los tejidos diana, se pueden someter a formación de complejos con lípidos catiónicos, se pueden envolver dentro de liposomas, o se pueden administrar a células diana por medio de otros métodos conocidos en la técnica. La administración localizada a los tejidos deseados se puede hacer por medio de un catéter, bomba de infusión o endoprótesis. El ADN, los complejos ADN/vehículo, o las partículas víricas recombinantes se administran localmente al sitio de tratamiento. Rutas alternativas de administración incluyen, pero sin limitarse a, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inhalación de aerosol, oral (forma de comprimido o de píldora), tópica, sistémica, ocular, intraperitoneal y/o intratraqueal. Ejemplos de administración de ribozima se proporcionan en Sullivan et al., documento WO 94/02595.

Los anticuerpos se pueden administrar únicamente como inyección intravenosa rápida, se pueden someter a infusión con el tiempo o se pueden administrar tanto en forma de inyección intravenosa rápida como de infusión con el tiempo. Los expertos en la técnica pueden emplear diferentes formulaciones para polinucleótidos y para proteínas. Similarmente, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, estados y ubicaciones particulares etc.

Como se ha comentado anteriormente, se pueden usar virus recombinantes para introducir ADN que codifica agentes de polinucleótido útiles en la presente invención. Generalmente, los virus recombinantes de acuerdo con la invención se formulan y se administran en forma de dosis de entre aproximadamente 10.sup.4 y aproximadamente 10.sup.14 pfu. En el caso de AAVs y adenovirus, preferentemente se usan dosis de aproximadamente 10.sup.6 a aproximadamente 10.sup.11 pfu. El término pfu ("unidad formadora de placa") corresponde al poder ineficaz de una suspensión de viriones y viene determinado por medio de infección de un cultivo celular apropiado y medida del número de placas formadas. Las técnicas para determinar el valor de pfu de una disolución vírica se encuentran bien documentadas en la técnica anterior.

Se describe un método para tratar o evitar una enfermedad que implica una disminución sistémica o local de la densidad ósea media, que comprende administrar a dicho sujeto una composición farmacéutica que mejora la formación ósea como se ha descrito anteriormente.

Se describe el uso de un agente como se ha descrito anteriormente para la preparación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad que implica una disminución sistémica o local de la densidad ósea media.

La enfermedad puede estar seleccionada entre el grupo que consiste en osteoporosis, hipercalcemia de tumor maligno, mielomatosis múltiple, hiperparatiroidismo y hipertiroidismo.

Se describe un método para diagnosticar una enfermedad patológica que implica una disminución sistémica o local de la densidad ósea media o una susceptibilidad a la enfermedad en un sujeto, que comprende determinar la cantidad del presente polipéptido en una muestra biológica, y comparar la cantidad con la cantidad del polipéptido en un sujeto sano, en el que el aumento de la cantidad de polipéptido en comparación con el sujeto sano es indicativo de la presencia de la enfermedad patológica.

La enfermedad patológica está seleccionada entre el grupo que consiste en osteoporosis, hipercalcemia de tumor maligno, mielomatosis múltiple, hiperparatiroidismo y hipertiroidismo.

Los polipéptidos de los polinucleótidos empleados en los métodos descritos en el presente documento pueden estar libres en disolución, fijados a un soporte sólido, generados sobre una superficie celular, o ubicados intracelularmente. Para llevar a cabo los métodos resulta viable inmovilizar bien el polipéptido de la presente invención o bien el compuesto, con el fin de facilitar la separación de los complejos a partir de las formas no complejadas del polipéptido, así como también de adaptarlos a la automatización del ensayo. Se puede conseguir la interacción (por ejemplo, la unión) del presente polipéptido con un compuesto en cualquier recipiente apropiado para albergar los reaccionantes. Ejemplos de dichos recipientes incluyen placas de microlitro, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. Se puede proporcionar una proteína de fusión que añada un dominio que permita que el polipéptido se una a la matriz. Por ejemplo, el presente polipéptido se puede marcar con "His", y posteriormente puede ser adsorbido sobre placas de microlitro de Ni-NTA, o se puede producir la adsorción de fusiones de ProtA con los polipéptidos de la presente invención sobre IgG, que posteriormente se combinan con los lisatos celulares (por ejemplo, marcados con (35)^S) y el compuesto candidato, y se incuba la mezcla en condiciones favorables para la formación del complejo (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Tras la incubación, se lavan las placas para retirar cualquier marcaje no ligado, y se inmoviliza la matriz. Se puede determinar directamente la cantidad de radioactividad, o en el sobrenadante después de la disociación de los complejos. Alternativamente, se pueden disociar los complejos a partir de la matriz, se pueden separar por medio de SDS-PAGE y se puede cuantificar el nivel de la proteína que se une a la presente proteína a partir de técnicas electroforéticas normalizadas que usan gel.

También se pueden usar otras técnicas para inmovilizar la proteína sobre matrices en el método de identificación de compuestos. Por ejemplo, se pueden inmovilizar bien el presente polipéptido o el compuesto utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. Se pueden preparar las moléculas de proteína sometidas a tratamiento con biotina de la presente invención a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, estuche de tratamiento con biotina, Pierce Chemicals, Rockford, I11.), y se pueden inmovilizar en pocillos de placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (Pierce Chemicals). Alternativamente, se pueden someter a derivación anticuerpos reactivos con el presente polipéptido, pero que no interfieran con la unión del polipéptido al compuesto, en los pocillos de la placa, y se puede atrapar el presente polipéptido en los pocillos por medio de conjugación de anticuerpos. Como se ha descrito anteriormente, se incuban las preparaciones de un compuesto candidato marcado en los pocillos de la placa que presentan el presente polipéptido y se puede cuantificar la cantidad de complejo que queda atrapado en el pocillo.

Se describe un método para la producción in vitro de tejido óseo, que comprende las etapas de poner en contacto células de mamíferos no diferenciadas con una secuencia de polinucleótido durante un tiempo suficiente para diferenciar las células no diferenciadas dando lugar a osteoblastos, produciendo de este modo una matriz ósea continua.

El método comprende las etapas de:

(a) aplicar células de mamífero no diferenciadas sobre un sustrato para formar un sustrato celular,

(b) introducir una secuencia de polinucleótido o un vector que comprende una secuencia de nucleótidos durante un tiempo suficiente para diferenciar las células no diferenciadas dando lugar a osteoblastos, produciendo de este modo una matriz ósea continua.

De este modo, se proporciona un método para producir un sustrato con una matriz ósea desarrollado sobre el mismo, que se puede usar para proporcionar implantes que soportan carga, incluyendo prótesis para articulaciones, tales como articulaciones artificiales para cadera, articulaciones para rodilla y articulaciones para dedos, e implantes maxilofaciales, tales como implantes dentales. También se puede usar para dispositivos quirúrgicos especiales, tales como espaciadores, o sustancias de relleno de hueso, y para su uso en el aumento, obliteración o reconstitución de defectos óseos y hueso dañado o perdido. Se puede optimizar la formación ósea por medio de la variación de la mineralización, tanto de los procesos inductores como de los procesos conductores.

Una combinación para proporcionar un implante de soporte de carga (preferentemente revestido con una matriz como se ha descrito anteriormente) con una sustancia de relleno ósea que comprende una matriz como se ha descrito constituye un método ventajoso.

El método también es muy apropiado con relación a la cirugía de revisión, es decir, cuando se tienen que sustituir dispositivos quirúrgicos anteriores.

5 Las células no diferenciadas apropiadas son células de médula ósea, incluyendo células hematopoyéticas y en particular células estromales. Se ha comprobado que las células de médula, y especialmente las células estromales, son muy eficaces en el proceso de producción ósea cuando se toman de su entorno original.

10 Se pueden aplicar directamente las células no diferenciadas sobre el sustrato o se pueden multiplicar ventajosamente en ausencia del sustrato, antes de aplicarlas sobre el mismo. En esta última modalidad, las células todavía están sin diferenciar tras la multiplicación y, para los fines de la invención, todavía son denominadas células no diferenciadas. Posteriormente, se permite la diferenciación de las células. La diferenciación se puede inducir o se puede mejorar por medio de la presencia de inductores apropiados, tales como glucocorticoides, y dexametasona. Inductores de diferenciación especialmente apropiados son los agentes inhibidores de expresión de la presente invención.

15 El uso de células no diferenciadas proporciona varias ventajas. En primer lugar, su baja diferenciación implica una tasa de proliferación elevada y permite dirigir y controlar mejor la funcionalidad práctica. Además, el cultivo de estas células no solo produce la matriz ósea requerida que contiene componentes orgánicos e inorgánicos, sino que también tiene como resultado la presencia, en el medio de cultivo y en la matriz, de varios factores que son esenciales para el crecimiento del tejido y para la adaptación al tejido vivo existente. De igual forma, el medio de cultivo puede ser una fuente de factores activos tales como factores de crecimiento, a usar junto con el proceso de implante. Además, con frecuencia, dichas células no diferenciadas están disponibles en grandes cantidades y de manera más conveniente que, por ejemplo, las células óseas maduras, y exhiben una morbilidad menor durante la recuperación. Además, se pueden obtener células no diferenciadas a partir del paciente al cual va destinado el implante. El hueso que resulta de estas células es autólogo para el paciente y, de este modo, no induce respuesta inmunológica alguna. Se pueden producir matrices de espesor de 100 μm como resultado del uso de células no diferenciadas.

20 El sustrato sobre el cual se pueden aplicar las células no diferenciadas y se cultivan puede ser un metal, tal como titanio, una aleación de cobalto/cromo o acero inoxidable, una superficie bioactiva tal como fosfato de calcio, superficies poliméricas tales como polietileno, y similares. Aunque menos preferido, también se puede usar un material silíceo tal como materiales cerámicos de vidrio, como sustrato. Los más preferidos son metales, tales como titanio, y fosfatos de calcio, aunque fosfato de calcio no sea un componente indispensable del sustrato. El sustrato puede ser poroso o no poroso. Se pueden aplicar las células con una tasa de, por ejemplo, 10^3 - 10^6 por cm^2 , en particular de 10^4 - 2×10^5 células por cm^2 .

30 El medio de cultivo a usar en el método puede ser cualquier medio de cultivo comúnmente conocido tal como MEM (medio esencial mínimo). Ventajosamente, el medio puede ser un medio acondicionado. En este contexto, se entiende que un medio acondicionado es un medio en el que se han incubado previamente células similares, provocando que el medio contenga factores tales como polipéptidos, segregados por las células que son importantes para la proliferación y diferenciación celulares.

45 Se cultivan las células durante un tiempo suficiente para producir una capa matriz, por ejemplo, una capa matriz que tenga una espesor de al menos 0,5 μm , en particular de 1 hasta 100 μm , más en particular de 10-50 μm . Se pueden poner las células en contacto con el medio de cultivo durante por ejemplo 2-15 semanas, en particular 4-10 semanas.

50 La producción de la matriz, cuando se aplica a un sustrato, tiene como resultado un revestimiento continuo o cuasi-continuo que cubre el sustrato en al menos 50 %, en particular al menos 80 %, de su área superficial.

Se describen células de osteoblastos que se pueden obtener por medio del método anterior.

La invención se ilustra adicionalmente en las figuras y los ejemplos siguientes.

55 Figura 1. Osificación intramembranosa y endocondrial

Figura 2. Principio del ensayo de diferenciación de osteoblasto

60 Figura 3. Croquis de la placa de control de inactivación de 96 pocillos

Figura 4. Croquis de la placa de control de 384 pocillos

Figura 5. Rendimiento del placa de control de inactivación en el ensayo AP

65 Figura 6. Representación de diagrama de puntos de los datos de partida para una placa de detección SilenceSelect

Figura 7. Análisis de la sobre-regulación de BAP-ARNm frente a PLAP- o IAP-ARNm

Figura 8. Resultados del ensayo de mineralización

5 Figura 9. Esquema de toma de muestra con pipetas usado para la detección de Ad-ARNsh en 3 MOIs.

Ejemplos

10 Ejemplo 1. Desarrollo de un método de detección de alto rendimiento para la detección de fosfatasa alcalina endógena

Principio del ensayo

15 Se determinan células de progenitor mesenquimales (MPCs) para diferenciarlas dando lugar a osteoblastos en presencia de factores apropiados (por ejemplo, BMP2). Se desarrolló un ensayo para detectar dichos factores por medio del control de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (AP), un marcador temprano del programa de diferenciación de osteoblastos. Se sembraron MPCs en placas de 384 pocillos y se co-infectaron simultáneamente un día después con adenovirus que codificaban Coxsackie humano y el receptor adenovirus (hCAR; Ad-hCAR) y adenovirus ARNsi individuales (Ad-ARNsi) de la colección de SilenceSlect™. La co-infección de AdC15-hCAR/AdC20-hCAR aumenta la eficacia de infección de AdC01-ARNsi. Se determinó la actividad celular AP 13 días después del comienzo de la infección (13 dpi). La figura 2 ilustra el principio del ensayo.

Desarrollo del ensayo

25 Se aislaron MPCs a partir de médula ósea de voluntarios sanos, obtenidos tras consentimiento informado (Cambrex/Biowhittaker, Verviers, Bélgica).

30 En una serie de experimentos, llevados a cabo en placas de 384 pocillos, se optimizaron varios parámetros: densidad de siembra de células, multiplicidades de infección (MOI) de virus control (Ad-BMP2 o Ad-eGFP), MOI de Ad-hCAR, duración de la infección, toxicidad, eficacia de infección (usando Ad-eGFP) y día de lectura.

35 Usando Ad-BMP2 (sobre-expresión de BMP2) como control positivo para el desarrollo del ensayo, el siguiente protocolo dio como resultado el intervalo dinámico más elevado para el ensayo con la desviación estándar más baja sobre la señal de fondo: se sembraron MPCs en el día 0 en 500 células por pocillo de una placa de 384 pocillos y se co-infectaron al día siguiente usando una mezcla de Ad-hCAR (5 µl de una disolución de Ad-hCAR: MOI total de mezcla= 155,7) y 1 µl de virus Ad-control (Ad-BMP2 o Ad-eGFP; corresponde a un MOI teórico de 5000). En el día 5, se retiró el medio que contenía el virus y se sustituyó por medio nuevo que no contenía virus. Se leyó la sobre-regulación de fosfatasa alcalina en 13 dpi: se añadieron 15 µl de 4-metilumbeliferilosfato (MUP, Sigma) a cada pocillo, se incubaron las placas durante 15 minutos a 37 °C y se controló la actividad AP usando un lector de placa de fluorescencia (Fluostar, BMG).

45 Tras la optimización del ensayo, se llevó a cabo una pequeña detección piloto (103 virus Ad-ARNsi diferentes) con el uso de robots (dispensador de canal 96/384 Tecan Freedom 200 equipado con TeMO96, TeMO384 y RoMa, Tecan AG, Suiza). Se recogieron los aciertos de esta detección y se volvieron a someter a ensayo en el mismo ensayo. Se usaron los dos Ad-ARNsi que obtuvieron la puntuación más elevada (H9=H24-010; H10=H24-011) para generar una placa de control (placa de control de inactivación "Knock-down" (KD)) que contenía Ad-ARNsi. La figura 3 muestra la placa de control, una placa de 96 pocillos que contenía 3 virus de control negativos (N1, N2, N3) y 3 virus de control positivos (P1, P2, P3). Esta placa de control "de inactivación" contiene Ad-H9 (H24-010) y Ad-H10 (H24-011) como controles positivos; Ad-eGFP (virus de inserción) como control de la infección; y Ad-eGFP-ARNsi, Ad-M6PR-ARNsi y Ad-Luc-ARNsi (los 3 son virus de inactivación) como controles negativos.

Se tomaron los virus de control con pipeta a partir de placas de 96 pocillos y se introdujeron en placas de 384 pocillos usando robots. El croquis final de la placa de 384 pocillos se muestra en la figura 4.

55 La figura 5 muestra resultados del procedimiento automatizado de detección que usa la placa control KD. Se usaron la media y las desviaciones estándar de los controles negativos KD (N1-N3) para calcular el corte para el análisis de aciertos, que se fijó en la media para N1, N2, N3 ("todos negativos") más 3 veces la desviación estándar para "todos negativos". Los controles positivos (P1 y P2), obtuvieron puntuación en más de un 95 % de los pocillos infectados. Los virus de control negativo obtuvieron puntuación en menos de un 5 % de los pocillos.

60 Ejemplo 2. Detección de 2760 adenovirus Ad-ARNsi en el ensayo de osteogénesis

65 El protocolo optimizado para la detección de la biblioteca SilenceSelect es el siguiente: en el día 0, se sembraron células MPC en placas de 384 pocillos negras con fondo transparente (Costar o Nunc) en 60 µl de medio a una densidad de 500 células por pocillo. Un día después, se transfirió 1 µl de virus Ad-ARNsi desde la colección

SilenceSelect™, almacenado en placas de 384 pocillos (valor estimado de $2,5 \times 10^9$ partículas víricas por ml) y 5 µl de disolución de Ad-hCAR (MOI total = 155), suministrados en placas de 96 pocillos con forma de V, con ayuda de un dispensador de canal 96/384 (Tecan Freedom 200 equipado con TeMO96, TeMO384 y RoMa, Tecan AG, Suiza) a partir de los pocillos de una placa de 96 pocillos que contenía la disolución de Ad-hCAR en cada uno de los pocillos de las placas de 384 pocillos que contenían MPCs. Se llevó a cabo la placa de control KD en las mismas condiciones que las placas de alícuota a partir de la colección SilenceSelect. Se detectaron virus Ad-ARNsi por duplicado, con cada singular en una placa MPC diferente. Posteriormente, se incubaron las placas a 37 °C. Cuatro días después de la infección se sustituyó el medio que contenía los adenovirus por medio nuevo libre de virus. Trece días después de la infección, se llevó a cabo la lectura de actividad AP. La figura 6 muestra un resultado típico de una placa de detección de 384 pocillos, en la que se representan unidades de fluorescencia relativas (RFU) para cada uno de los puntos de datos de la placa de 384 pocillos sobre el eje-Y; mientras que los números del eje X corresponden a las posiciones en la placa de 384 pocillos.

Se llevó a cabo esta detección por duplicado dos veces, y se usaron los cuatro puntos de datos para la determinación de aciertos (véase Ejemplo 3).

Ejemplo 3. Identificación diana usando el ensayo AP

Tras llevar a cabo estas 2 detecciones, se analizaron los datos obtenidos a partir de la medición de la actividad AP como se muestra a continuación: se calculó el valor de fondo tomando la media de los puntos de datos a partir de todas las placas excepto la placa de control. Se calculó el valor límite para la determinación de aciertos añadiendo 3 veces la desviación estándar de todos los puntos de datos, excluyendo la placa de control. Se analizó la puntuación de cada punto de datos para ver si estaba por encima o por debajo del valor límite. Únicamente se consideraron de interés adicional los Ad-ARNsi que inducían niveles de actividad AP endógena por encima del valor límite. Se priorizaron los aciertos de acuerdo con sus puntuaciones en individual o por duplicado, en una o ambas detecciones. Se recogieron los datos para 2688 estructuras de virus Ad-ARNsi que representaban 2657 estructuras de KD independientes y se listan en la tabla 2. Se comprobó que uno de los aciertos identificados era un factor anabólico óseo antes y por tanto, valida el ensayo.

H24-241: BMP3

BMP3 es un miembro de la familia de proteínas morfogenéticas óseas de proteínas segregadas. BMP3 funciona como antagonista para BMP2 osteogénico. Los ratones BMP3-completo tienen el doble de hueso trabecular que los animales salvajes lo que indica que BMP3 es un regulador negativo de la homeostasis ósea *in vivo* (Daluisi et al., *Nature Genetics* (2001) 27: 84-88).

Ejemplo 4. Control de calidad de Ad-ARNsi diana

Se sometieron los aciertos Ad-ARNsi a control de calidad en el inserto ARNsi.

Se propagaron los Ad-ARNsi diana usando células PerC6 (Crucell, Leiden, Países Bajos) a nivel de placa de 96 pocillos, seguido de la re-detección de estos virus a varios MOIs en el ensayo principal (véase Ejemplo 1) y por medio de secuenciación de los ARNsi codificados por los virus Ad-ARNsi diana.

Se sembraron células PerC6/E2A en placas de 96 pocillos a una densidad de 40 000 células por pocillo en 180 µl de medio de PerC6/E2A. Posteriormente se incubaron las células durante la noche a 39 °C en un incubador humidificado con un 10 % de CO₂. Un día después, se infectaron las células con 1 µl de lisato celular bruto de surtido SilenceSelect que contenía Ad-ARNsi diana. Se incubaron las células de manera adicional a 34 °C, 10 % de CO₂ hasta la aparición de un efecto citopático (como quedó revelado por el hinchamiento y redondeo de las células, normalmente 7 días después de la infección). Se recogió el sobrenadante y se trató el lisato bruto del virus con proteinasa K: se añadieron 12 µl de lisato bruto a 4 µl de tampón de lisis (1 x tampón Expand High Fidelity con MgCl₂ (Roche Molecular Biochemicals, Cat. N° 1332465) complementado con 1 mg/ml de proteinasa K (Roche Molecular Biochemicals, Cat N° 745 726) y 0,45 % de Tween-20 (Roche Molecular Biochemicals, Cat N° 1335465) en tubos de PCR estériles. Se incubaron estos a 55 °C durante 2 h seguido de un etapa de inactivación de 15 minutos a 95 °C. Para la reacción de PCR, se añadió 1 µl de lisato a un mezcla maestra de PCR formada por 5 µl de tampón 10x Expand High Fidelity con MgCl₂, 0,5 µl de mezcla dNTP (10 mM para cada dNTP), 1 µl de "primero de avance" (surtido 10 mM, secuencia: 5'CCG TTT ACG TGG AGA CTC GCC, SEQ ID NO: 311), 1 µl DE "primero inverso" (surtido 10 mM, secuencia: 5'CCC CCA CCT TAT ATA TAT TCT TTC C, SEQ ID NO: 312), 0,2 µl de ADN polimerasa Expand High Fidelity (3,5 U/µl, Roche Molecular Biochemicals) y 41,3 µl de H₂O. Se llevó a cabo PCR en un sistema PE Biosystems GeneAmp PCR 9700 como se muestra a continuación: se incubó la mezcla de PCR (50 µl en total) a 95 °C durante 5 minutos; cada uno de los 35 ciclos posteriores se llevó a cabo a 95 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 4 minutos. Se llevó a cabo una incubación final a 68 °C durante 7 minutos. Se mezclaron 5 µl de la mezcla de PCR con 2 µl de tampón de carga de gel x 6, se introdujeron en un gel de agarosa de 0,8 % que contenía 0,5 µg/µl de bromuro de etidio para resolver los productos de amplificación. Se estimó el tamaño de los fragmentos amplificados a partir de una escala de ADN introducida en el

mismo gel. El tamaño esperado fue de ~ 500 bp.

Para el análisis de secuenciación, se amplificaron las estructuras de ARNsi expresadas por los adenovirus diana por medio de PCR usando primeros complementarios a las secuencias de vectores que flanqueaban el sitio SapI del plásmido pPspAdapt6-U6. Se determinó la secuencia de los fragmentos de PCR y se comparó con la secuencia esperada.

Ejemplo 5: Análisis de sobre-regulación de ARNm AP óseo endógeno frente al ARMm AP placentar o intestinal

BAP es AP fisiológicamente relevante implicado en la formación ósea. Con el fin de determinar si las actividades AP medidas fueron debidas a la sobre-regulación de la expresión de BAP o de otro producto génico AP, se analizaron los niveles de ARNm para todos los genes AP para MPCs infectados. Se determinaron los niveles de ARNm como se describe en las secciones anteriores. La diferencia está en el conjunto de primeros usado (véase la tabla 1): un conjunto detecta la expresión de ARNm de BAP ALPL (fosfatasa alcalina humana hígado/hueso/riñón). Otro conjunto detecta la expresión de los otros 3 genes AP (ALPI fosfatasa alcalina intestinal humana), ALPP (fosfatasa alcalina placentar humana (PLAP)) y ALPPL2 (fosfatasa alcalina de tipo placentar humana)). ALPI, ALPP y ALPPL2 son altamente similares en el nivel de nucleótidos y pueden, por tanto, amplificarse usando un par de primeros.

En primer lugar se validaron los pares de primeros sobre ARN aislado a partir de MPCs infectados con Ad-eGFP y Ad-BMP2. La figura 7 muestra la sobre-regulación intensa de ARNm de BAP por parte de Ad-BMP2 y la ausencia de sobre-regulación de la expresión de cualquiera de los otros genes AP. Se infectaron los MPC en un formato de placas de 24 pocillos usando Ad-eGFP (control negativo) o el Ad-BMP2 osteogénico. Se recogieron las células y se preparó ARN y se sometió a rRT-PCR usando conjuntos de primeros que amplificaban ARNm BAP o ARNm de los otros 3 genes AP (PLAP/IAP). Ad-BMP2 sobre-regula intensamente los niveles de ARNm de BAP pero no los niveles de ARNm de los otros 3 genes AP.

Posteriormente, se usaron ambos conjuntos de primeros para medir los niveles de ARNm para todos los genes AP en ARN aislado a partir de los MPC infectados con Ad-ARNsi.

Tabla 1: Conjuntos de primeros AP

Nombre	Secuencia	SEQ ID N°:
JDO-05 F (PLAP)	TTCCAGACCATTGGCTTGAGT	313
JDO-05bis R (PLAP/ALPI/ALPPL2)	ACTCCCACTGACTTTCCTGCT	314
JDO-21F (BAP)	CATGCTGAGTGACACAGACAAGAAG	315
JDO-21R (BAP)	TGGTAGTTGTTGTGAGCATAGTCCA	316

Ejemplo 6: Mineralización

El proceso de osteogénesis consiste en varios eventos sucesivos. Durante las fases iniciales de la osteogénesis, se produce la sobre-regulación de la fosfatasa alcalina ósea (BAP). No obstante, es igualmente importante apreciar los eventos específicos que tienen lugar en las etapas posteriores de la osteogénesis tal como la mineralización.

Configuración del ensayo

El proceso de osteogénesis consiste en varios eventos sucesivos. Durante las fases iniciales de la osteogénesis, tiene lugar la sobre-regulación de la fosfatasa alcalina ósea (BAP). Posteriormente, durante la diferenciación, las células depositan (hidroxi)apatita (precipitado de fosfato-Ca²⁺) sobre la matriz extracelular que consiste principalmente en colágeno de tipo I para formar hueso mineralizado.

En el ensayo de mineralización celular ósea (ensayo BM), se diferencian MSCs humanas primarias *in vitro* para dar lugar a osteoblastos de mineralización usando BMP2 (recombinante o suministrado por medio de transducción adenovírica) como agente osteogénico. Posteriormente, se visualiza la mineralización por medio de tinción de los MSCs con Rojo de Alizarina, un colorante con una elevada afinidad por el calcio (véase la figura 8).

Detección y determinación de aciertos

Se usó el siguiente protocolo optimizado para detectar Ad-ARNsi y Ad-ADNc diana identificados en el ensayo de principal:

Se sembraron 100.000 MPCs en cada pocillo de una placa de 6 pocillos en 2 ml de medio MSC, que contenía un 10 % de FCS. Al día siguiente, tras la incubación a 37 °C, 10 % de CO₂ en un incubador humidificado, se co-infectaron las células con AdC15-hCAR (MOI final de 750) y Ad-ARNsi, Ad-ADNc o virus de control a un MOI final de 1250, 2500 y 5000. Se incubaron las células a 37 °C, un 10 % de CO₂ en un incubador humidificado durante otros seis

días. Se retiró el virus y se sustituyó por 2 ml de medio de MSC nuevo, 10 % de FCS. Durante los próximos 22 días, se añadió medio nuevo 3 veces en 2 semanas. Durante el resto del tiempo, se añadió medio nuevo a la mitad o por completo. A los 28 días después del comienzo del experimento, se retiró el medio acondicionado, se fijaron las células usando 10 % de paraformaldehído y se tiñeron las monocapas con 1 ml de Rojo de Alizarina de ~ 1 % (Sigma, A5533) en agua MilliQ (pH ajustado a 4,2). Se incluyeron Ad-eGFP, para evaluar la eficacia de infección, Ad-MBP2 como inductor osteogénico intenso y Ad-H4-2 como factor osteogénico débil en cada experimento como controles negativo y positivo, respectivamente. Se repitió por completo cada experimento en el cual Ad-H4-2 no indujo mineralización.

10 La tabla 2 presenta los Ad-ARNsh que indujeron mineralización.

Ejemplo 7. Descubrimiento de fármaco contra las dianas identificadas

15 Se detectan los compuestos para unión a los polipéptidos de la presente invención. Se determina la afinidad de los compuestos a los polipéptidos en un experimento de desplazamiento. Dichos experimentos de desplazamiento se conocen bien en la técnica, y se pueden considerar como técnica común entre otras para identificar compuestos que se unen a polipéptidos.

20 En breve, los polipéptidos de la presente invención se incuban con un ligando marcado (radio-marcado, fluorescente o marcado con anticuerpo, o cualquier otro marcador detectable) que se sabe se une al polipéptido y se incuban de manera adicional con un compuesto no marcado.

25 Se determina el desplazamiento del ligando marcado a partir del polipéptido midiendo la cantidad de ligando marcado que todavía se asocia al polipéptido. La cantidad de ligando marcado asociada al polipéptido es un indicativo de la afinidad por el compuesto marcado.

30 Se representa la cantidad de ligando marcado asociada al polipéptido frente a la concentración del compuesto no marcado para calcular los valores IC50. Este valor refleja la afinidad de unión del compuesto no marcado a su diana, es decir, los polipéptidos de la presente invención.

35 Se considera que los compuestos son aglutinantes intensos, cuando tienen un IC50 en el intervalo de nanomolar e incluso picomolar. Los compuestos que tienen un IC50 de al menos 10 micromoles o incluso mejor en el intervalo de nmol a pmol se aplican bien en el ensayo de fosfatasa alcalina ósea (BAP) y/o en los ensayos para determinar su efecto sobre la inducción de marcadores de osteoblastos y función de los osteoblastos. Generalmente, se considera que los compuestos con un IC50 más bajo son de menor interés. Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar de un número de formas dependiendo de si el ensayo se lleva a cabo sobre células, fracciones celulares o bioquímicamente, sobre proteínas purificadas. Dichas preparaciones se conocen en la técnica, ya que son ensayos diferentes.

40 Ejemplo 8. Ensayos de osteoclastos: actividad de anti-resorción de dianas identificadas

45 A lo largo de la vida, el esqueleto está en constante estado de remodelación. Se produce la resorción de las áreas focales por medio de los osteoclastos y posteriormente son sustituidas por matriz ósea formada nuevamente por los osteoblastos. El desarrollo de osteoporosis se caracteriza por una pérdida ósea grave debida a la desregulación del equilibrio entre la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, lo que conduce a una mayor resorción ósea mediada por los osteoclastos.

50 Los osteoclastos emanan de células del tipo monocito/macrófago. In vivo, la diferenciación de células precursoras de osteoclastos hacia osteoclastos está controlada por medio de dos factores centrales expresados por medio de células estromales (MPCs): activador del receptor del ligando NFkB (RANKL) y osteoprotegerina (OPG). RANKL es un ligando unido a membrana expresado sobre la superficie de MPCs que acciona la diferenciación de osteoclastos. OPG es un receptor soluble para RANKL que inhibe la diferenciación de osteoclastos por medio de captura del RANKL activo. El equilibrio entre RANKL y la expresión de OPG por medio de MPCs determina el nivel de diferenciación de osteoclastos.

55 Debido a que MPC controla la diferenciación de los osteoclastos, es importante conocer el efecto de los Ad-ARNsi diana identificados sobre la diferenciación de los osteoclastos o actividad. Los Ad-ARNsi diana que disminuyen la actividad/diferenciación de osteoclastos son muy valiosos, ya que se espera que aumenten la aposición ósea por medios de dos mecanismos: aumento de la diferenciación / actividad de los osteoblastos y disminución de la actividad de osteoclastos. Como queda ilustrado por medio de diferentes precedentes (Thirunavukkarasu et al., (2000) J Biol Chem 275:25163-72; Yamada et al., (2003) Blood 101:2227-34) cabe esperar dicho efecto pleiotrópico de los factores osteogénicos.

65 *Ensayo de diferenciación de osteoclastos*

Se evalúa el efecto de los factores osteogénicos sobre la osteoclastogénesis a través de dos tipos de ensayos.

En una primera configuración de ensayo, se lleva a cabo un cocultivo de MPCs con células mononucleares humanas primarias. Se evalúa el efecto de la infección de la monocapa MPC con un virus de inactivación sobre su capacidad para soportar la osteoclastogénesis. El efecto deseado es el siguiente: inactivación de la expresión génica diana de Ad-ARNsi en los MPCs debería inhibir la diferenciación de osteoclastos accionada por medio de un desencadenante fisiológico como por ejemplo una mezcla de $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}_3$ 10 nM y M-CSF 50 nM. Se pueden usar los monocitos procedentes de médula ósea o de sangre periférica. En el presente ejemplo, se describe un experimento de diferenciación basado en células mononucleares procedentes de sangre periférica (PBMCs). Se siembran MPCs (obtenidos en Cambrex/Biowhittaker, Verviers, Bélgica) en placas de 96 pocillos (1000 células por pocillo) en un medio α -MEM (GIBCO-Life Technologies) complementado por FBS de 10 % y un día después, se infectan con Ad-ARNsi diana. Al menos tres días después, se añaden 100 000 PBMCs por pocillo así como también M-CSF (R&D Systems, concentración final de 50 ng/ml). Se sustituye la mitad del volumen del medio dos veces por semana por medio + 50 ng/ml de M-CSF y $1,25(\text{OH})_2\text{vitD}_3$ 10 nM. Se lleva a cabo la lectura 14 días después de la adición de los PBMCs al cocultivo. Se puede evaluar la diferenciación de osteoclastos espontánea accionada por medio de la mezcla fisiológicamente relevante de desencadenantes, por medio de lecturas múltiples. Generalmente, la evaluación microscópica del número de "TRAP positivo", células multinucleadas por pocillo, es una medida aceptada para el nivel de diferenciación de osteoclastos. "TRAP positivo" significa que las células poseen actividad de fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP). Para evaluar esto, se somete el cocultivo a una tinción TRAP *in situ* llevada a cabo de acuerdo con el estuche de detección de fosfatasa ácida (SIGMA, 386-A). Las células positivas adquieren un color púrpura tras el tratamiento. Como lectura alternativa, se mide un marcador específico para osteoclastos maduros, por ejemplo TRACP5b (fosfatasa de tipo 5B ácida resistente a tartrato), receptor de calcitonina (CRT) o Cathepsina K (CTSK). La medición de las cantidades de proteína de fosfatasa ácida resistente a tartrato procedente de osteoclasto (TRACP5b) en el sobrenadante del cocultivo se lleva a cabo por medio de ELISA disponible comercialmente (ensayo BoneTRAP, Sba sciences, Turku, Finlandia). Se detectan CTR o CTSK por medio de inmunquímica, tras la aplicación del siguiente protocolo general. Se retira el medio y se fija el cocultivo (4 % de paraformaldehído, 0,1 % de TritonX-100, 4 °C, 30 minutos), se lava y se añade tampón de bloqueo (PBS + 1 % de BSA + 0,1 % de Tween 20) para una incubación de al menos 4 horas. Se retira el agente de bloqueo y se añade el anticuerpo primario dirigido contra Cathepsin K (por ejemplo, Oncogene, IM55L) o el receptor de Calcitonina (por ejemplo, Serotec AHP635), disuelto a la concentración deseada en un tampón apropiado (por ejemplo, Tris HCl 0,05M a pH 7,4, 1 % de BSA) a los pocillos. Se lleva a cabo la incubación durante la noche, 4 °C. Se retira la mezcla, se lavan las células (PBS + 0,1 % de Tween 20) y se añade anticuerpo apropiado secundario conjugado con HRP, diluido en el mismo tampón que el anticuerpo primario. Tras una incubación de al menos 4 horas, se lleva a cabo una etapa de lavado (PBS + 0,1 % de Tween 20) se añade luminol (un sustrato para que HRP produzca una señal luminiscente: Sustrato de ELISA Quimioluminiscente BM [POD] (luminol), Roche Diagnostics, Cat N° 1582950). Tras 5 minutos de incubación, se lleva a cabo la lectura con un luminómetro (Luminoskan Ascent, Labsystem). Los 2 ensayos descritos (evaluación de la cantidad de células multinucleares e inmunquímica para la detección de marcadores específicos de osteoclastos) permiten evaluar la diferenciación de las células mononucleares para generar osteoclastos, pero no aportan información sobre la actividad de resorción ósea de los osteoclastos formados.

Se mide la actividad de los osteoclastos en el ensayo de formación de depresión. Para tal fin, se lleva a cabo el cocultivo y la infección de las células como se ha descrito para los ensayos descritos anteriormente con la diferencia de que un sustrato de tipo óseo está presente en la parte inferior del pocillo en el que se lleva a cabo el co-cultivo. Este sustrato de tipo óseo puede ser una lámina de dentina (por ejemplo, Kamiya Biomedical Company, Seattle (Cat N° KT018)) o equivalente (revestimiento de carbonato de calcio, OAASTM, Gentaur; BiocoatTM OsteologicTM, BD Biosciences) que está comercialmente disponible. Se lleva a cabo el co-cultivo durante al menos 14 días sobre el sustrato de tipo óseo. Posteriormente se retiran las células por medio de tratamiento con hipoclorito de sodio y se puede evaluar el área de resorción por parte de los osteoclastos (la depresión de resorción) de forma microscópica. Esto se puede facilitar por medio del tratamiento superficial de la lámina de dentina con azul de toluidina.

En una segunda configuración de ensayo, se mide el efecto de la infección de las células precursoras de osteoclastos (PBMCs o BMMCs) con un virus de acierto sobre su capacidad para la diferenciación hasta un osteoclasto en un ensayo de monocultivo. Para tal fin, se siembran monocitos (PBMCs o BMMCs) en una placa de 384 pocillos en un medio α MEM complementado con 10 % de suero y M-CSF recombinante de 25 ng/ml (R&D Systems). Un día después de la siembra, se infectan las células con Ad-ARNsi diana. Cuatro días después de la infección, se añade RANKL recombinante a los pocillos (25 ng/ml, R&D Systems). Se repone el medio dos veces a la semana. Catorce días después de la adición de RANKL, se mide la diferenciación de los monocitos hasta osteoclastos usando una de las lecturas descritas para la primera configuración de ensayo. Este ensayo permite la identificación de los factores que son indispensables para la respuesta de las células precursoras de osteoclastos a M-CSF o RANKL.

Aislamiento de PBMC

Los PBMCs se obtienen a partir de sangre periférica (obtenida de pacientes tras consentimiento informado) sometidos al siguiente protocolo. Se vierte asépticamente la sangre en el interior de tubos de Falcon de 50 ml y se centrifuga a 3000 g durante 10 min a 25 °C. Posteriormente, se recoge el revestimiento color ante y se diluye 1:1 con

PBS. Se vierte el revestimiento color ante diluido sobre la parte superior de 20 ml de Lymphoprep (Sigma) presentes en un tubo de Falcon de 50 ml. Tras centrifugación (35 minutos a 400 g a 25 °C), se recoge una capa blanca de células mononucleares sobre la parte superior de Lymphoprep y se lava dos veces con PBS (centrifugación a 200 g, 10 minutos, 25 °C) y se rediluye en 7 ml de PBS. Se toma esta disolución con pipeta y se coloca sobre la capa de 7 ml de gradiente de Percoll hiperosmolar presente en un tubo de Falcon de 15 ml y se centrifuga durante 35 minutos a 400 g a 25 °C. Se prepara el gradiente de Percoll hiperosmolar como se muestra a continuación: se mezclan 1 volumen de NaCl 1,5 M y 9 volúmenes de Percoll (Pharmacia, d=1.130 g/ml). Se añade esta mezcla 1:1 a PBS/tampón de citrato (NaH₂PO₄ 1,49 mM, Na₂HPO₄ 9,15 mM, NaCl 139,97 mM, Na-citrato (dihidratado) 13 mM, pH 7,2). Tras centrifugación, los monocitos forman un anillo discreto sobre la parte superior del gradiente. Se recogen los monocitos y se lavan en el medio de cultivo. Posteriormente, las células están listas para ser usadas en los ensayos.

Ejemplo 9. Análisis de efecto de inactivación "fuera de diana"

ARNsi ejercen la inactivación de la expresión de gen a través del mecanismo descubierto y parcialmente comprendido. Se acepta generalmente que el atemperado específico de la secuencia de ARNsi hasta ARNm es el responsable del fenómeno de inactivación "sobre diana" específico del gen. No obstante, no se puede excluir que un desajuste limitado entre ARNsi y otro ARNm pueda inducir la regulación a la baja "fuera de diana" de la expresión del gen. Con el fin de excluir que ese efecto de inactivación de (un) ARNm(s) "fuera de diana" fuese responsable del efecto osteogénico observado, se diseñaron ARNsi/ARNsh adicionales para 5 dianas (tabla 2B) que indujeron mineralización usando criterios de diseño estrictos. Posteriormente, se sometieron a ensayo los Ad-ARNsh en el ensayo de BAP.

Galapagos ha desarrollado un algoritmo que incorpora por un lado los criterios de diseño publicados y por otro, los criterios de diseños patentados (el algoritmo de Galapagos incorpora los criterios publicados para el diseño de ARNsi tal como las normas Tuschl y las normas de Reynolds et al. Nat. Biotechnol. 2004 Mar; 22(3):326-30). Las últimas incluyen criterios tales como la baja estabilidad interna termodinámica en el extremo antisentido 5' de la secuencia de ARNi y el "contenido GC"). Para abordar la cuestión de los posibles efectos "fuera de diana", se diseñaron secuencias de ARNsi adicionales que:

- se alinean perfectamente con el ARNm dirigido por medio del ARNsi original,

- se pueden alinear de forma imperfecta (máximo de no identidad de 2 pares de bases comprobada para cada posición del 19mer) con un número mínimo de ARNm "fuera de diana" de manera que:

los ARNm "fuera de diana" putativos fueran diferentes de los ARNm "fuera de diana" putativos identificados para el ARNsi original,

los ARNm "fuera de diana" putativos fueran diferentes de los ARNm "fuera de diana" putativos identificados para todos los ARNsi diana originales, exceptuando para los ARNsi adicionales diseñados para PPIA.

Se procesaron 7 ARNsi adicionales, diseñados para cada uno de los 5 genes diana seleccionados, para derivar adenovirus recombinantes. Se sometieron todos los ARNsi a secuenciación tras clonado, con el fin de verificar sus identidades y excluir errores debidos a la síntesis de oligonucleótidos.

Se generaron 3 Ad-ARNsh de forma satisfactoria y se sometieron a ensayo BAP en 3 MOIs en 2 experimentos independientes, en paralelo con los 5 Ad-ARNsh originales. Se produjeron adenovirus recombinantes que codificaban para los ARNsh diseñados (Ad-ARNsh), se sometieron a valoración y se tomaron alícuotas en placas de 96 pocillos y se almacenaron a -80 °C. Se procesaron estas placas y el ensayo de BAP primario como se muestra a continuación:

Se sembraron células MPC con un Multidrop 384 (Labsystems) en placas de 384 pocillos negras con una parte inferior transparente (Costar o Nunc) en 60 µl de medio MSC que contiene 10 % de suero de ternera fetal (FCS) (medio patentado por Progentix, Países Bajos) a una densidad de 500 células por pocillo. Una días después, se descongeló una placa de 96 pocillos que contenía Ad-ARNsh tomado en alícuotas y otra que contenía virus de control negativo y positivo (placa de control de inactivación, figura 3) y se transfirieron alícuotas de virus a la placa MPC usando un dispensador de 96 canales (Tecan Freedom 200 equipado con un TeMO96 y un accionador manual de placa RoMa, Tecan AG, Suiza) (figura 9). Para la placa de control, se transfirió 1 µl de surtido de virus (valor medio de 2×10^9 partículas víricas por ml) a placas de detección de 384 pocillos. Se detectaron Ad-ARNsh en 3 multiplicidades de infección (MOIs): 12.000, 4.000 y 1.333. Se transfirieron los virus desde la placa de reserva de 96 pocillos a tres placas de 384 pocillos (figura 9). A continuación, se transfirieron 5 µl de adenovirus que expresaba Coxsackie humano y receptor de adenovirus (hCAR) (AdC15-hCAR/AdC20-hCAR) al interior de estos pocillos (MOI final de 155) a partir de una placa inferior en V de 96 pocillos con ayuda de un dispensador de 96 canales.

Posteriormente, se incubaron las placas a 37 °C, 10 % de CO₂ en un incubador humidificado durante cuatro días. Cuatro días después de la infección, se sustituyó el medio que contenía los adenovirus por 60 µl de medio MSC que

contenía un 10 % de FCS libre de virus. Tras nueve días adicionales de incubación, se retiró el medio, se añadieron 15 µl de disolución de 4-metilumbeliferilfosfato (Sigma, # M3168) a cada pocillo y se midió la fluorescencia de 4-metilumbeliferona liberada por la actividad de la fosfatasa alcalina, tras 15 minutos de incubación a 37 °C usando un fluorímetro (excitación: 360 nm; emisión: 440 nm; FluoStar, BMG).

5 Se detectaron todos los virus Ad-ARNsh por duplicado en 3 MOIs en dos detecciones idénticas pero independientes. Se calcularon los valores umbral para la determinación de aciertos usando por un lado todos los controles negativos presentes en una ronda de detección (análisis "Global") y por otro, usando los controles negativos presentes en una placa de detección (análisis "Local"). Se determinaron los aciertos de acuerdo con la siguiente selección de criterios:

- 10 1) Señales BAP mayores que la media más 3 veces ($\mu + 3\sigma$) la desviación estándar de los controles negativos. Se analizaron de forma independiente los dos puntos de datos individuales para cada virus del lote.
- 15 2) Se definen las señales BAP positivas por medio del criterio 1 en el que Ad-ARNsh obtiene la puntuación a al menos un MOI por duplicado en al menos una de las 2 detecciones.

Un análisis "Global" de los datos identificó 8 ARNsi que se dirigían a 5 locus y el análisis "Local" identificó 9 ARNsi que se dirigían a 5 locus. La tabla 3 presenta la identidad de 5 genes seleccionados junto con el número final de ARNsi que obtuvieron puntuación en el ensayo BAP. Todos los 5 Ad-ARNsh originales obtuvieron puntuación en el ensayo de BAP basado tanto el análisis "Global" como en el análisis "Local".

Tabla 3: Identificación de ARNsi múltiples para las dianas validadas seleccionadas en el ensayo BAP

ID de gen	Redundancia del análisis global	Redundancia del análisis local	ID de gen	Redundancia del análisis global	Redundancia del análisis local
AGTRL1	2	3	GPR39	3	3
DRD5	3	3	PDE11A	3	3
ENSG00000172441	2	2			

25 En la tabla 3, los números indican todos los ARNsi que obtuvieron puntuación en el ensayo BAP, incluyendo los 5 ARNsi originales.

En conclusión, se diseñaron y construyeron Ad-ARNsh adicionales que se dirigieron a 5 dianas seleccionadas. Se usaron controles negativos presentes en las placas de control por placa (análisis "Local") o por lote de placas (análisis "Global") para determinar el valor límite para la determinación de aciertos ($\mu + 3\sigma$).

30 - El análisis "Global" dio como resultado 8 virus que obtuvieron puntuación positiva en el ensayo BAP, confirmando 5 de las 5 dianas validadas.

35 - El análisis "Local" dio como resultado 9 virus que obtuvieron puntuación positiva en el ensayo BAP, confirmando 5 de las 5 dianas validadas.

- Todos los 5 virus Ad-ARNsh originales obtuvieron puntuación en el ensayo BAP cuando se usaron bien en el análisis "Global" o bien en el análisis "Local".

40 La tabla 2A recoge un listado de los polipéptidos, polinucleótidos y estructuras de inactivación.

ID Acierto	Secuencia diana	Símbolo del gen	Acceso GenBank	Nombre	SEQ ID NO			Puntuación en el ensayo de mineralización descrito en el Ejemplo 6
					Estructura KD	Polinucleótido	Polipéptido	
H24-229	TGCAGGCCCTGCCATTGTC	SLC7A1	NM_003045	Familia de vehículo de soluto (transportador catiónico de amino ácidos, sistema y+) miembro 1	1	78	194	
H24-230	GAAGATTACAGGCGAGATC	PDLIM7	NM_005451 NM_203350- NM_203353	MDZ Y LIM dominio 7 (enigma)	2	79-81	195-197	

ES 2 427 177 T3

H24-231	CTCTGGAAGGAGTCATTAC	RAD50	NM_005732	homólogo RAD50 (<i>S. cerevisiae</i>) (RAD50), variante de transcripción 1	3	82	198	
H24-233	CACTAAGGTGCAGTGCTAC	AGTRL 1	NM_005161	receptor de tipo 1 de angiotensina II	4	83	199	X
H24-235	GGTGTACTTCACCAACGCC	SCN4A	NM_000334	conductor de sodio, desconectado con voltaje, tipo IV, alfa	5	84	200	
H24-236	GCTTCTGAAGACCACAGTC	KCNJ1	NM_000220-NM_153764-NM_153765-NM_153766-NM_153767	conducto de rectificación hacia el interior de potasio, subfamilia J, miembro 1	6	85-89	201-205	
H24-237	CTACCTGCTGGAGAACTTC	ENTPD 2	NM_001246-NM_203468	ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 2	7	90-91	206-207	
H24-238	TGGCACAGTGATCGTGGAC	CLCA1	NM_001285	conducto de cloruro, activado con calcio, miembro de familia 1	8	92	208	
H24-239	CCTGTTCAGAACGATGGGC	CLCN6	NM_001286	conducto de cloruro 6 (CLCN6), variante de transcripción CIC-6a	9	93	209	
H24-241	TTGCGCCAGGAGATACTC	BMP3	NM_001201	proteína 3 morfogénica ósea (osteogénica) (BMP3)	10	94	210	X
H24-242	CGCCTCAAAGAGAAATTC	ABCA5	NM_018672NM_172232	estuche de unión de ATP, sub-familia A (ABC1), miembro 5	11	95-96	211-212	
H24-243	CTCTCTGTGGTCAACACGC	SLC2A 7	NM_207420	familia 2 de vehículo de soluto (transportador de glucosa facilitado) miembro 7	12	97	213	
H24-244	GGAAGGGTATCTGGAAGCC	GPD2	NM_000408	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial)	13	98	214	
H24-245	CAGCAGGAAGGAGATTCAC	GALNT L2	NM_054110	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina: polipéptido N-acetilgalactosaminil-transferasa-tipo 2	14	99	215	X
H24-246	GCACCTGCACTTGCTCGAC	B3GN-T6	NM_138706	proteína beta-1,3-N-acetilglucosaminil-transferasa (B3Gn-T6)	15	100	216	X
H24-247	GTTGACTAATCCTCCTTCC	LOC25 7478	XM_054745	similar a precursor de proteína 1 de homólogo de corte de locus neurogénico (Corte 1) (hN1) (Translocación asociada a la proteína de corte TAN-1)	16	101	217	
H24-248	CATGGAGTGCTCTAGATCC	LOC25 4325	XM_172351	similar a peptidilprolil isomerasa A (ciclofilina A)	17	102	218	

ES 2 427 177 T3

H24-249	TCGAAGAGGTGCCGACCAC	NET01	NM_138966NM_153181	neurofilina (NRP) y de tipo toloide (TLL) 1	18	103-104	219-220	
H24-250	TTGGACAAATCAGGGTCTC	PPP3R 2	NM_147180	proteína fosfatasa 3 (antiguamente 2B), subunidad reguladora B (19kD), beta isoforma (calcineurina B, tipo II)	19	105	221	
H24-251	TCCAGAGTACTTCAGCGCC	INSRR	NM_014215 XM_043563	receptor relacionado con receptor de insulina	20	106-107	222-223	
H24-252	CCAATTTGCCTGTAGTGCC	GPR14 5	NM_032503	receptor 145 acoplado a proteína G	21	108	224	
H24-253	GTGGAAGGCGATGCACAAC	CTSL	NM_001912 NM_145918	catepsina-L	22	109-110	225-226	
H24-254	CTTGTGGACAGGCCAGATC	LOC12 6767	XM_060167	similar a arilacetamido desacetilasa (esterasa)	23	111	227	
H24-255	GCATGAGTTTCTGACCAGC	SMOC2	NM_022138	SPARC relacionado con unión 2 de calcio modular	24	112	228	
H24-256	CTATTGTTCCAGTGGAGGC	LOC15 9121	XM_099028	LOC159121	25	113	229	X
H24-257	GTTTAAGGCAGCCAACATC	PDE11 A	NM_016953	fósodiesterasa 11A	26	114	230	X
H24-259	CTTAGTTTCCAGCAGGACC	STK19	NM_004197 NM_032454	Serina/treonina quinasa 19	27	115-116	231-232	
H24-260	GATCGGGTCCACCTGTCC	SLC9A 3	NM_004174	familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador sodio/hidrógeno), isoforma 3	28	117	233	
H24-261	TTTGTGGTGTGCATGGCTC	HTR3A	NM_000869 NM_213621	receptor 3A de 5-hidroxitriptamina (serotonina)	29	118-119	234-235	
H24-262	TGCCAGCACCATTGGAAGC	SLC9A 1	NM_003047	familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador sodio/hidrógeno), isoforma 1 (antiportador, Na ⁺ /H ⁺ , amiloride sensible)	30	120	236	
H24-263	GTCCGAGAGCGAAGAGAGC	GPR39	NM_001508	receptor 39 acoplado a proteína G	31	121	237	X
H24-264	GCAGGTGAAGAAGATCGAC	ADRB1	NM_000684	receptor beta-1 adrenérgico	32	122	238	
H24-265	TAAGATTGAAGGGCTGGAC	EPHX1	NM_000120	epóxido hidrolasa 1, microsomal (xenobiótico)	33	123	239	
H24-266	GGGTGTGGTCTGAATTACC	PRKD1	NM-002742	proteína quinasa D1	34	124	240	

ES 2 427 177 T3

H24-267	CATCTTGCATGAGATTGAC	KCNJ1 2	NM_021012	conducto de rectificación hacia adentro de potasio, subfamilia J, miembro 12	35	125	241	
H24-268	GAGATCCGGGAGAGAAATC	AFG3L 2	NM_006796	gen 3 de familia AFG3 ATPasa - tipo 2 (levadura)	36	126	242	
H24-269	GTGCCGGATGCGCATCTTC	SLC12 A4	NM_005072	familia 12 de vehículo de soluto (transportadores de potasio/cloruro), miembro 4	37	127	243	
H24-270	TACCAGTATGGTGGCAACC	ENTPD 5	NM_001249	ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa 5	38	128	244	
H24-271	GGGCTTCGTTTCTGCTCTC	KCNK4	NM_016611 NM_033310 NM_033311	miembro 4, subfamilia K, conducto de potasio	39	129-131	245-247	
H24-272	GCAAGTTCCTACAGCATC	MAP2K 6	NM_002758 NM_031988	proteína quinasa 6 activada por mitogen	40	132-133	248-249	X
H24-273	CTGTGCAGCTGCAGGGAAC	TIE1	NM_005424	tirosina quinasa con dominios 1 de tipo EGF y de tipo inmunoglobulina	41	134	250	
H24-274	TTGGAACAGCTGGACCAGC	ABCC1 1	NM_032583 NM_033151 NM_145186	estuche de unión de ATP, sub-familia C (CFTR/MRP), miembro 11	42	135-137	251-253	
H24-275	CCAGGATGTAATCAATGCC	EPHB2	NM_004442 NM_017449	receptor B2 de EPH	43	138-139	254-255	
H24-276	ACTCTCCGAAAGCATGGCC	LOC13 7057	XM_059898	similar a proteína hipotética FLJ10661	44	140	256	
H24-277	CGGAATGCAAGGAGATTGC	SLC39 A12	NM_152725	miembro 12, familia 39 de vehículo de soluto (transportador de cinc)	45	141	257	
H24-278	GCTTCCAAGGAGCAGGTTTC	HS3ST 5-LOC22 2537	NM_153612XM_167035	heparan sulfato (glucosamina) 3-O-sulfotransferasa 5 / similar a precursor de heparan sulfato D-glucosaminil 3-O-sulfotransferasa 1; heparin-glucosamina 3-O-sulfotransferasa	46	142-143	258-259	X
H24-279	ATATACATTTACCCCTAGC	LOC16 8415-LOC25 6726	XM-095086 XM_172596	similar a NADH deshidrogenasa subunidad 4L	47	144-145	260-261	
H24-280	TCCCGCACTTGCCGAAGTC	ENSG0 0000172441	ENSG00000172441	anotado usando algoritmos patentados	48	146	262	X
H24-281	TGCAAACGGCATTTCATCC	FOLR1	NM_000802 NM_016724 NM_016725 NM_016729 NM_016730 NM_016731	receptor 1 de folato (adulto)	49	147-152	263-268	

ES 2 427 177 T3

H24-282	CATCTTGCTGAACCTGGAC	SLC26 A6	NM_022911 NM_134263 NM_134426	miembro 6, familia 26 de vehículo de soluto	50	153-155	269-271	
H24-283	ATTAATGACCTCACAGACC	SLC15 A1	NM_005073	miembro 1, familia 15 de vehículo de soluto (transportador de oligopéptido)	51	156	272	
H24-284	TGTCCAGGGATATTGTGTC	ENSG00000124860 KIAA1639-Obecn	ENSG00000124860 XM_290923 SK601	proteína KIAA1639	52	157-159	273-275	
H24-285	GTGTCATGAGCEACCTTAC	KCNS3	NM_002252	miembro 3, subfamilia S, rectificador retardado, conductor desconectado con voltaje de potasio	53	160	276	
H24-286	TGTGCTCAAATGACACCTC	SCNN1 G	NM_001039	conducto de sodio, no desconectado con voltaje 1, gamma	54	161	277	
H24-287	GGGTAGTCAGTACTGGCGC	VTN	NM_000638	vitronectina (factor de dispersión de suero, somatomedina, B, complemento S, proteína)	55	162	278	
H24-288	ACGTTTGGATAAAGTTGGC	LOC163812	XM_089158	similar a cadena chi de clase III de alcohol deshidrogenasa (formaldehido deshidrogenasa (FDH) dependiente de glutation)	56	163	279	
H24-289	TGAGCAGTTGAAGAAGACC	NRD1	NM_002525	nardilisina (N-arginina dibásica convertasa)	57	164	280	
H24-290	ACAACCTGGCCAACTGGAC	DRD5	NM_000798	receptor D5 de dopamina	58	165	281	X
H24-291	GATCCAAGAGGCCCTGCAC	RASSF 1	NM_007182 NM_170712 NM_170713 NM_170714 NM_170715 NM_170716 NM_170717	asociación Ras (Ra1GDS /AF=6) familia de dominio 1	59	166-172	282-288	
H24-292	CCCATACTGTGGAGAAATC	ZNF354 A	NM_005649	proteína de dedo de cinc 354A	60	173	289	
H24-293	GCGACTGGTGAGCGAGATC	OLIG2	NM_005806	factor 2 de transcripción de oligodendrocito	61	174	290	
H24-294	TGGTTCTCTCCCGACTGC	PIK3R4	NM_014602	fósfoinosítide-3-quinasa, subunidad reguladora 4, p150	62	175	291	
H24-295	AATCTTGTGCCAAGAGGC	PCM1	NM_006197	material pericentriolar 1	63	176	292	
H24-296	ATGCCAGACAATGCAGTGC	LOC389873 SEPHS 1	XM_372233 NM_012247	selenofosfato sintetasa 1	64	177-178	293-294	

ES 2 427 177 T3

H24-297	GAGCAGACAAACGAAGGGC	KCND2	NM_012281	miembro 2, subfamilia relacionada de Shal, conducto desconectado por voltaje de potasio	65	179	295	
H24-298	CTGTTCAGCAGTGGCCGAC	TNFRS F25	NM_003790 NM_148965 NM_148966 NM_148967 NM_148968 NM_148969 NM_148971 NM_148972 NM_148973 NM_148974	receptor de factor de necrosis tumoral, miembro de superfamilia 25	66	180-189	296-305	X
H24-299	ATGGCACTGTGTGGACTGC	USP44	NM_032147	proteasa 44 específica de ubiquitina	67	190	306	
H24-300	GATCTCCACTGAGGACATC	PCK1	NM_006201 NM_033018 NM_033019	proteína quinasa 1 PCK1	68	191-193	307-309	

Tabla 2B: Adición al sumario de polinucleótidos, polipéptidos y estructuras de inactivación

Secuencia diana KD	Símbolo de Gen Diana	Acceso a GenBank	Nombre	SEQ ID NO		
				Estructura KD	Polinucleótido	Polipéptido
CACCACTAAGGTGCAGTGC	AGTRL1	NM_005161	receptor de angiotensina de tipo 1	69	83	199
CACGTACCGGGACTATGAC	AGTRL1	NM_005161	receptor de angiotensina de tipo 1	70	83	199
CGTGTGTCAGCTGATGTTT	PDE11A	NM_016953	Fosfodiesterasa 11A	71	114	230
CACCAGTGGTGAATTTAC	PDE11A	NM_016953	Fosfodiesterasa 11A	72	114	230
CCTCAGCTCGGTCATCAAC	GPR39	NM_001508	Receptor 39 acoplado a proteína G	73	121	237
TATTCTGGTGTACCTGATC	GPR39	NM_001508	Receptor 39 acoplado a proteína G	74	121	237
TACGTTCTACTGAAGGCC	ENSG00000172441	ENSG00000172441	Anotado que usan algoritmos patentados	75	146	262
ACTTTCAGAAGGTGTTTGC	DRD5	NM_000798	Receptor D5 de dopamina	76	165	281
CTTCCATCAAGAAGGAGAC	DRD5	NM_000798	Receptor D5 de dopamina	77	165	281

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar un compuesto que induce diferenciación de células de mamíferos no diferenciadas para dar lugar a osteoblastos, que comprende:
- 5 (a) poner en contacto un compuesto con una fosfodiesterasa 11A, PDE11A, polipéptido, y
- (b) medir una propiedad de compuesto-polipéptido relacionada con la diferenciación de dichas células;
- 10 en el que:
- i) dicho polipéptido es una preparación *in vitro* libre de células y dicha propiedad es una afinidad de enlace de dicho compuesto a dicho polipéptido, y
- 15 ii) dicha propiedad es la activación de un mecanismo biológico que produce un marcador bioquímico indicador de la diferenciación de dichas células.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho marcador biológico es fosfatasa alcalina ósea.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que dicho compuesto está seleccionado entre el grupo que consiste en compuestos de una biblioteca de detección disponible comercialmente y compuestos que tienen afinidad de enlace por un polipéptido que comprende dicha secuencia de amino ácidos.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido es un péptido de una biblioteca de muestra de bacteriófagos o una biblioteca de fragmentos de anticuerpos.

Osificación intramembranosa

Osificación endocondrial

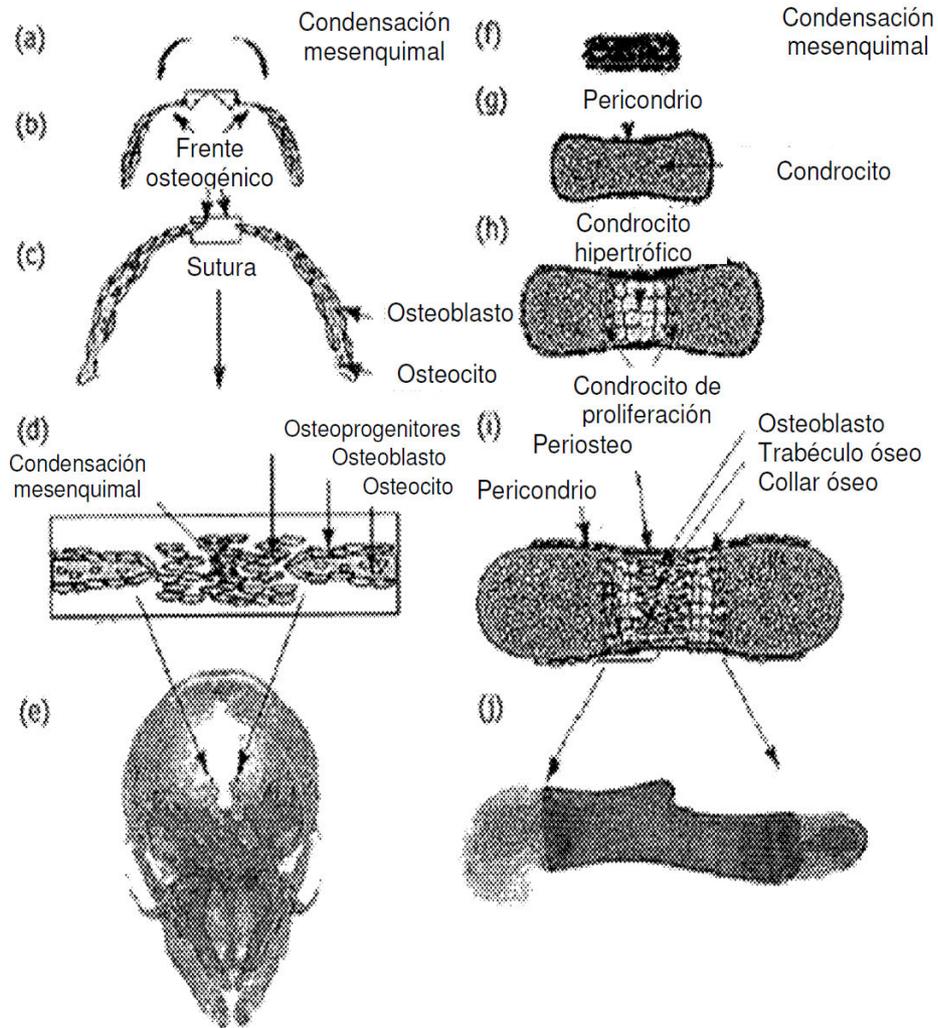


FIGURA 1

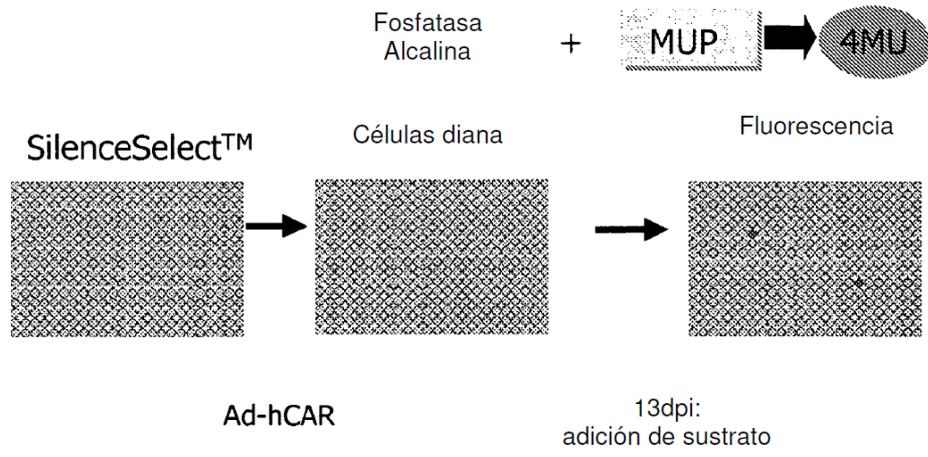


FIGURA 2

P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3
N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1
F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1
N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2
F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2
N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3
P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3
N1	F2	N2	F3	N3	P1	N1	F2	N2	F3	N3	P1

P1: H2A-D10
 F2: H2A-D11
 F3: eGFP

N1: mSP
 N2: MPR
 N3: lucif

FIGURA 3

Placa de 384 pocillos preparada a partir de 1 placa de 96 pocillos con medio
 Se usa esta placa como placa fuente para la detección

P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3
P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3	
N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1
N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1	
P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1
P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1	
N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2
N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2	
P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2
P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2	
N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3
N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3	
P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3
P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3	
N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1	N1	N1	P2	P2	N2	N2	P3	P3	N3	N3	P1	P1
N1		P2		N2		P3		N3		P1		N1		P2		N2		P3		N3		P1	



FIGURA 4

	Media	Desviación estándar	Valor límite (=media (N1-3) + 3 x SD (N1-3))				% positivo
P1	20320	5018					98
P2	21063	3138					100
P3	2738	600					0
N1	2940	1584					4
N2	3565	1268					2
N3	3385	962					0
Blanco	3707	1118					1
Todos negativos	3297	1314	7239				

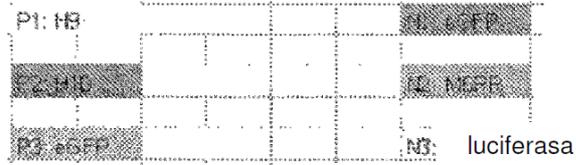


FIGURA 5

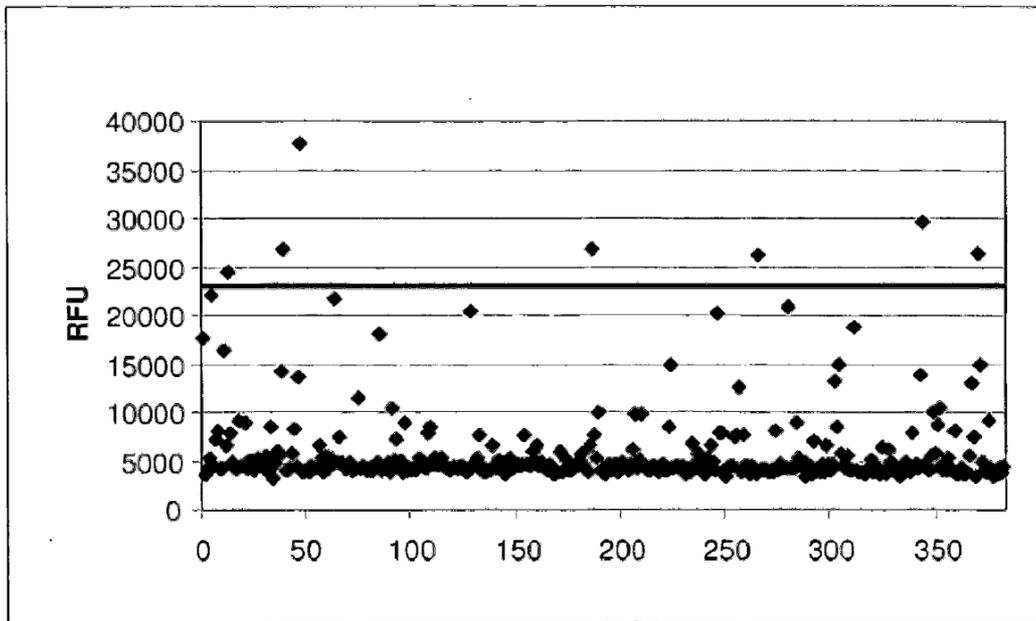


FIGURA 6

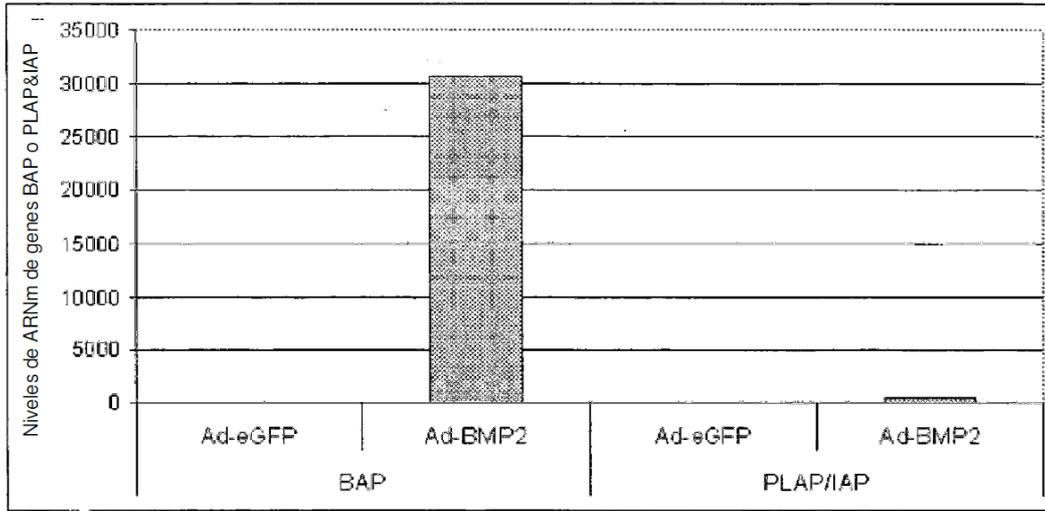


FIGURA 7

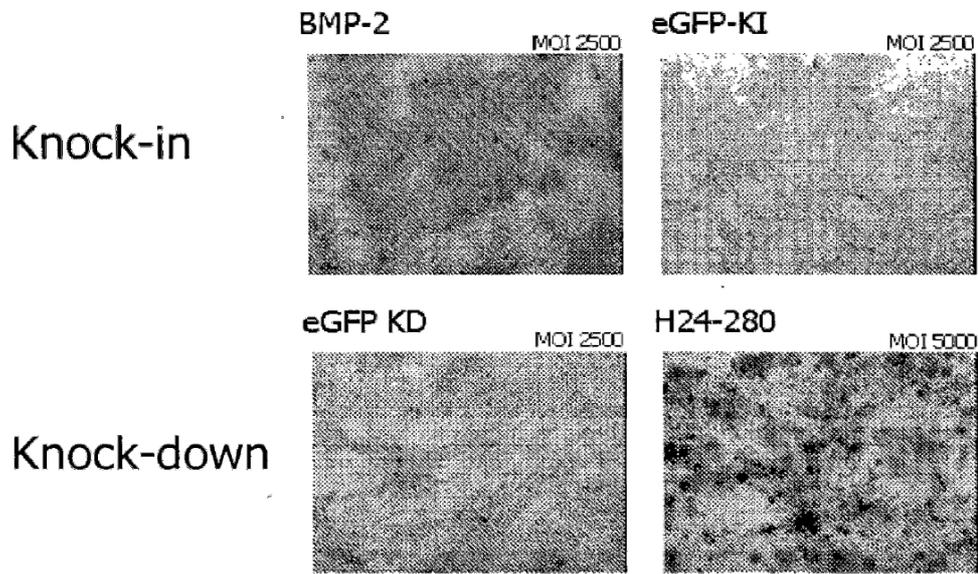


FIGURA 8

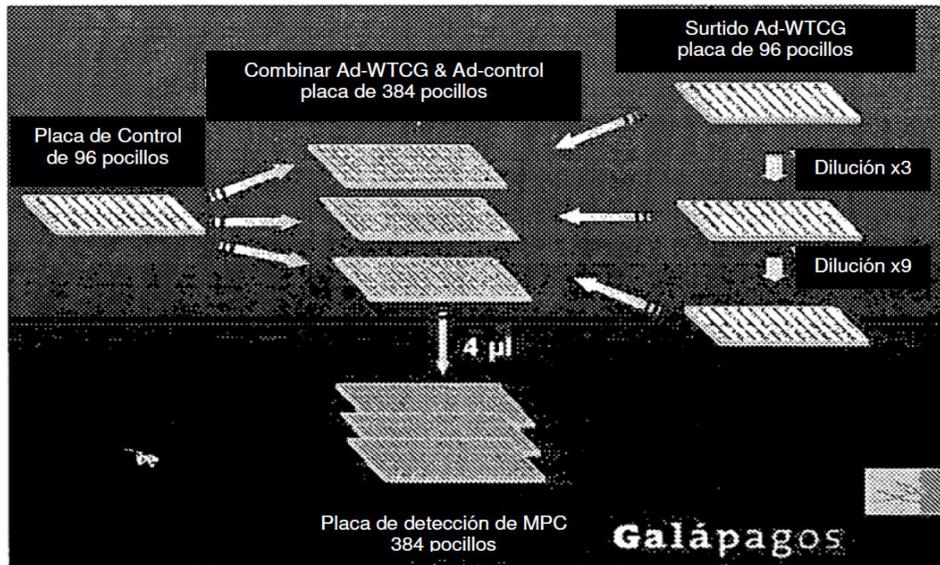


FIGURA 9